



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>



Tesis Doctoral

Universidad Autónoma de Barcelona
Programa de Doctorado en Medicina
Departamento de Medicina

CARACTERIZACIÓN EPIGENÉTICA DE LA HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL ESPACIAL Y TEMPORAL. COMPARATIVA ENTRE TUMOR PRIMARIO Y METÁSTASIS HEPÁTICAS DE CÁNCER COLORECTAL.

Autor

José Luís Manzano Mozo

Directores de TESIS

Anna Martínez Cardús

Albert Abad Esteve

Tutor de TESIS

Evarist Feliu Frasnado

Barcelona, 2022



Tesis Doctoral

Universitat Autònoma de Barcelona
Programa de Doctorado en Medicina
Departamento de Medicina

CARACTERIZACIÓN EPIGENÉTICA DE LA HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL ESPACIAL Y TEMPORAL. COMPARATIVA ENTRE TUMOR PRIMARIO Y METÁSTASIS HEPÁTICAS DE CÁNCER COLORECTAL

Tesis doctoral presentada por:

José Luís Manzano Mozo

Para optar al grado de Doctor, por la Universidad Autònoma de Barcelona.

Directora

Anna Martínez Cardús

Director

Albert Abad Esteve

Tutor

Evarist Feliu Frasnado

Barcelona, 2022

Agradecimientos

A mi familia, para los que están, y los que no están, que se han sacrificado en darme todas las oportunidades para poder crecer, y llegar dónde estoy.

A mis directores:

Al Dr. Abad, por ser mi mentor en toda mi formación como profesional, por su creatividad, y sobretodo, por transmitir esa ilusión y pasión en el día a día, por las cosas que verdaderamente importan, encontrando siempre soluciones a los problemas.

A la Dra. A. Martínez Cardús por ser tan real, por hacer fácil lo complejo, por convertir las dudas en soluciones, en resumen, por encarar la vida desde una visión postiva y constructiva.

A mi tutor:

Al Dr. E. Feliu, por su accesibilidad y excelente trato hacia mi persona.

A mis compañeros de trabajo, por su apoyo, sin reservas en el día a día.

Abreviaturas

APC	Adenomatous Polyposis Coli
AD	Autosómico Dominante
ADNtc	ADN tumoral circulante
AR	Autosómico Recesivo
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ARNm	ARN mensajero
BRAFm	BRAF mutado
CAPE	Capecitabina
CB	Masa central Tumoral
CCR	Cáncer Colorrectal
CCRM	Cáncer Colorrectal metastásico
CIN	Inestabilidad Cromosómica
CIMP	Fenotipo metilador en islas CpG
CMS	Consenso Molecular Subtipo
DNMT	ADN metiltransferasa
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial
EH	Homogeneidad Epigenética
E	Estadio
ER	Receptor Estrógenos
FAP	Poliposis Adenomatosa Familiar
Fig.	Figura
HNPCC	Cáncer Colorrectal No Polipósico
IF	Frente Invasivo
Inv.	Invasión
IncARNs	largas regiones no codificantes de ARN
MMR	Miss Match Repair
MYTH AP	MYH Poliposis Asociada
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinasa
MGMT	MetilGuaninaMetilTransferasa
MSI	Inestabilidad de microsatélites
MSS	Estabilidad de Microsatélites
Mets.	Metástasis

Abreviaturas

miARNs	micro ARN
ncARN	no codificante ARN
NLR	Ratio neutrófilos /linfocitos
PS	Perfomance Status
PR	Receptores Progesterona
REB.	Reparación por Escisión de Bases
SG	Supervivencia Global
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
SCNA	Número de copias somáticas
Tej.	Tejido
TEM	Microcirugía Endoscópica Transanal
TMB	Carga mutacional tumoral
TS	Superficie del Tracto Digestivo
UICC	Unión Internacional contra el Cáncer
VEGF	Factor del Crecimiento del Endotelio Vascular
VIM	Vimentina
χ^2	prueba estadística de Chi-Cuadrado
5FU IC	5-Fluorouracilo en Infusión Continua

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	5
Summary	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 EPIDEMIOLOGÍA	13
1.2 CAUSAS Y FACTORES DE RIESGO	14
1.3 CARCINOGENESIS DEL CÁNCER COLORECTAL	15
1.4 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN	19
1.5 FACTORES PRONÓSTICOS	20
1.6 TRATAMIENTO DEL CANCER COLORECTAL	23
1.6.1 Cirugía en el cáncer colorectal	23
1.6.2 Radioterapia en el tratamiento del cáncer de recto	24
1.6.3 Tratamiento sistémico del CCR avanzado	25
1.6.3.1 Neoadyuvancia en el cáncer de colon localizado	25
1.6.3.2 Adyuvancia en el cáncer de colon localizado	26
1.6.3.3 Tratamiento del CCR con enfermedad avanzada	27
1.6.3.3.1 Neoadyuvancia CCR metastásico	27
1.6.3.3.2 Tratamiento del CCR no operable	28
1.6.4 Factores moleculares pronóstico predictivos de eficacia para la selección de tratamiento	30
2.1 BIOMARCADORES EN ONCOLOGÍA	32
2.2 CLASIFICACIÓN MOLECULAR	33
2.2.1 Clasificación molecular basada en el TCGA	34
2.2.2 Subtipos moleculares basados en CMS	35
2.3 HETEROGENEIDAD TUMORAL	37
2.3.1 Tipos de heterogeneidad tumoral	38
2.3.2 Modelos de heterogeneidad intratumoral	39
2.3.3 Heterogeneidad tumoral en el CCR	41
2.4 EPIGENÉTICA	43
2.4.1 Definición	43
2.4.2 Mecanismos epigenéticos en cáncer	43
2.4.2.1 Mecanismos de metilación del ADN	43
2.4.2.2 Modificaciones de histonas	44
2.4.2.3 Regulación mediante ARN no codificante	45
2.4.3 La metilación del ADN como biomarcador en el CCR	45
2.4.4 Uso de perfiles de metilación para la identificación de	

biomarcadores en CCR	47
2. HIPÓTESIS	49
3. OBJETIVOS	53
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	55
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	55
4. MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1 DISEÑO ESTUDIO	59
4.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO ...	59
4.3 RECOGIDA DATOS	60
4.3.1 Tipos de variables	60
4.4 ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE MUESTRAS	60
4.4.1 Delimitación de regiones intratumorales	60
4.4.2 Extracción ADN. Control Calidad	61
4.4.3 Conversión con bisulfito del ADN	62
4.4.4 Análisis de metilación de ADN mediante microarray	63
4.4.5 Análisis datos de metilación del ADN	63
4.4.6 Cálculo del coeficiente de homogeneidad epigenético	65
4.4.7 Caracterización histopatológica del tumor	65
4.4.8 Análisis mutacional	66
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
5. RESULTADOS	69
5.1 OBJETIVO PRINCIPAL	71
5.1.1 Análisis descriptivo de la muestra. Análisis epigenético de metilación. Análisis de datos (parámetros histopatológicos) ...	71
5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	81
5.2.1 Análisis de heterogeneidad intertumoral	81
5.2.2 Análisis de heterogeneidad intratumoral	83
6. DISCUSIÓN	89
6.1 DISCUSIÓN DATOS CLÍNICOS	91
6.2 DISCUSIÓN HETEROGENEIDAD	93
6.3 DISCUSION POR OBJETIVOS	96
6.4 FORTALEZAS	101
6.5 DEBILIDADES	102
7. CONCLUSIONES	105
8. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS	109
9. BIBLIOGRAFÍA	113

RESUMEN

Resumen

Introducción: Durante el proceso de carcinogénesis del CCR, hay una acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas en la transición tejido normal-adenoma-adenocarcinoma. A partir de éstas, ha sido posible establecer un consenso de diferentes subtipos tumorales, y dónde se pone de manifiesto la heterogeneidad tumoral del CCR. A nivel clínico, sólo disponemos en el momento actual de la mutación en RAS, como factor de selección de tratamiento, por lo que globalmente tratamos a los pacientes de CCR de forma homogénea, pero su pronóstico es muy variable, probablemente por la propia heterogeneidad que esta neoplasia presenta. En este trabajo se pretende valorar el uso de la epigenética como herramienta diferenciadora de la heterogeneidad tumoral. Primero, analizando la heterogeneidad intratumoral espacial, determinando epigenéticamente cuáles son las regiones del propio tumor más divergentes, y posteriormente estudiando la heterogeneidad intertumoral e intratumoral temporal, definiendo las regiones del tumor que son más similares a la metástasis pareada.

Metodología: Se reclutaron muestras de tejido incluido en parafina de 79 pacientes con CCR, incluyendo 23 casos con metástasis hepáticas pareadas, desde 1990 hasta 2012, procedentes de H. Germans Trias i Pujol y del H. Valle Hebrón. Se incluyeron de forma retrospectiva habiendo firmado el consentimiento informado. En el Servicio de Anatomía Patológica se realizó la delimitación de las regiones a estudio, para una posterior macrodissección, y para el análisis de características histopatológicas de las muestras. El análisis de los perfiles de metilación del ADN se realizó mediante la tecnología de microarrays de Illumina, y el análisis de datos mediante el entorno estadístico R. El análisis estadístico de las variables clínico-patológicas y moleculares se realizó mediante el software SPSS.

Resultados: Brevemente, las características clínico-patológicas y moleculares de la cohorte de estudio fueron: edad mayor de 60 años en un 60%, enfermedad localizada en un 80%, localización colon izquierdo en un 60%, MSI 14%, fenotipo MSI y mutación en BRAF en un 14%, KRAS mutado en un 29%. Se delimitaron 3 regiones intratumorales: una más cercana al tracto digestivo (TS), una masa tumoral central (CB) y el frente invasor (IF). Se analizó el perfil de metilación de

cada región en cada paciente, mostrando diferencias estadísticamente significativas en solamente un 9% de posiciones CpG analizadas, siendo la heterogeneidad intertumoral mayor que la intratumoral, así como el IF de la región intratumoral más epigenéticamente diferente en un 49% de los casos. A partir de la conversión cuantitativa del nivel de heterogeneidad intratumoral mediante la generación de un coeficiente, se determinó una asociación significativa con el pronóstico de la enfermedad en esta cohorte, siendo los casos más homogéneos, los que presentan un pronóstico más pobre. Por último, en el contexto de la heterogeneidad intratumoral temporal, observamos que la región intratumoral del tumor primario más epigenéticamente parecida a su metástasis pareada era la TS.

Conclusiones: Existe la heterogeneidad intratumoral a nivel epigenético, siendo el frente invasor la región más epigenéticamente diferente. La heterogeneidad intratumoral se presenta en solamente un 9% de posiciones interrogadas, y es menor que la intertumoral, pero sus niveles tienen un papel como factor pronóstico en la presente cohorte. La región intratumoral que presenta mayor similitud epigenética con su metástasis pareada es la TS, hipotetizando que la extravasación metastásica se podía dar en fases tempranas de la progresión tumoral.

SUMMARY

Summary

Introduction: During the carcinogenesis process of CRC, there is a progressive accumulation of genetic and epigenetic alterations in the normal tissue-adenoma-adenocarcinoma transition. Based on these, it has been possible to establish a consensus of different tumor subtypes, and where the tumor heterogeneity of CRC is revealed. At the clinical level, nowadays only mutations in RAS are used as treatment selection factor, so globally CRC patients are homogeneously treated, though their prognosis is highly variable, probably due to the heterogeneity that this neoplasia presents. In this work we want to assess the use of epigenetics as a differentiating tool for tumor heterogeneity, firstly analyzing spatial intratumoral heterogeneity, secondly determining epigenetically which are the most divergent regions of the tumor itself, and later studying intertumoral and temporal intratumoral heterogeneity, defining the regions of the tumor that are most similar to paired metastasis.

Methodology: Paraffin-embedded tissue samples were recruited from 79 CRC patients, including 23 cases with paired liver metastases, from 1990 to 2012, from H. Germans Trias i Pujol and H. Valle Hebron. They were included retrospectively, having signed the informed consent. In the Pathological Anatomy Service, the delimitation of the study regions was carried out, for a subsequent macrodissection, and for the analysis of histopathological characteristics of the samples. Analysis of DNA methylation profiles was performed using Illumina microarray technology, and data analysis using R statistical environment. Statistical analysis of clinicopathological and molecular variables was performed using SPSS software.

Results: Briefly, the clinical-pathological and molecular characteristics of the study cohort were: 60% age older than 60 years, 80% localized disease, 60% left colon localization, MSI 14%, MSI phenotype and mutation in BRAF by 14%, KRAS mutated by 29%. 3 intratumoral regions were delimited: one closer to the digestive tract (TS), a central tumor mass (CB) and the invasive front (IF). The methylation profile of each region was analyzed in each patient, showing statistically significant differences in only 9% of the CpG positions analyzed, intertumoral heterogeneity being greater than intratumoral, as well as the IF of the intratumoral region more

epigenetically different by 49 % of the cases. From the quantitative conversion of the level of intratumoral heterogeneity through the generation of a coefficient, a significant association with the prognosis of the disease in this cohort was determined, with the most homogeneous cases being those with a poorer prognosis. Finally, in the context of temporal intratumoral heterogeneity, we observed that the intratumoral region of the primary tumor most epigenetically similar to its paired metastasis was the TS.

Conclusions: There is intratumoral heterogeneity at the epigenetic level, with the invasive front being the most epigenetically different region. The intratumoral heterogeneity is present in only 9% of the interrogated positions, and it is lower than the intertumoral heterogeneity, but its levels have a role as a prognostic factor in the present cohort. The intratumoral region that presents the greatest epigenetic similarity with its paired metastasis is the TS, hypothesizing that metastatic extravasation could occur in the early stages of tumor progression.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial (Fig.1). En el 2020, el CCR, fue la tercera causa más frecuente de cáncer, comprometiendo al 10% de los tumores diagnosticados (1.849.518 nuevos casos estimados por año), tras el cáncer de pulmón y de mama; siendo la segunda causa de mortalidad, 9,2% (880.792 número de muertes estimadas por año) tras el cáncer de pulmón.

En términos geográficos, la incidencia y prevalencia del CCR ha aumentado en los países industrializados del mundo occidental, aunque hay que decir que en los últimos años las tasas de incidencia, y mortalidad han presentado un gran incremento en la Europa del Este, Latino América y Asia¹.

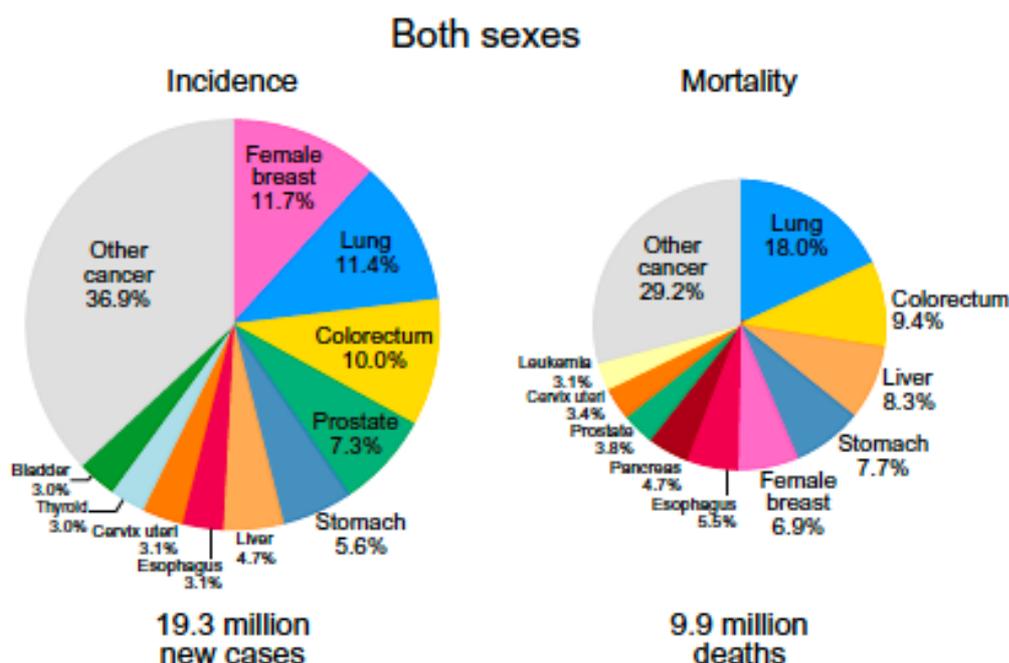


Figura 1. Gráficos de incidencia y mortalidad de los 10 tipos tumorales más frecuentes en ambos sexos a nivel mundial. (Fuente GLOBOCAN 2020, ver referencia 1).

El incremento, tanto en la prevalencia como en la incidencia del CCR, parece estar derivado del estilo de vida occidental, con aumento de ingesta de carnes rojas, bajo consumo de fibra y verduras, y la obesidad, debiendo añadirse factores genéticos y ambientales (Fig. 2).

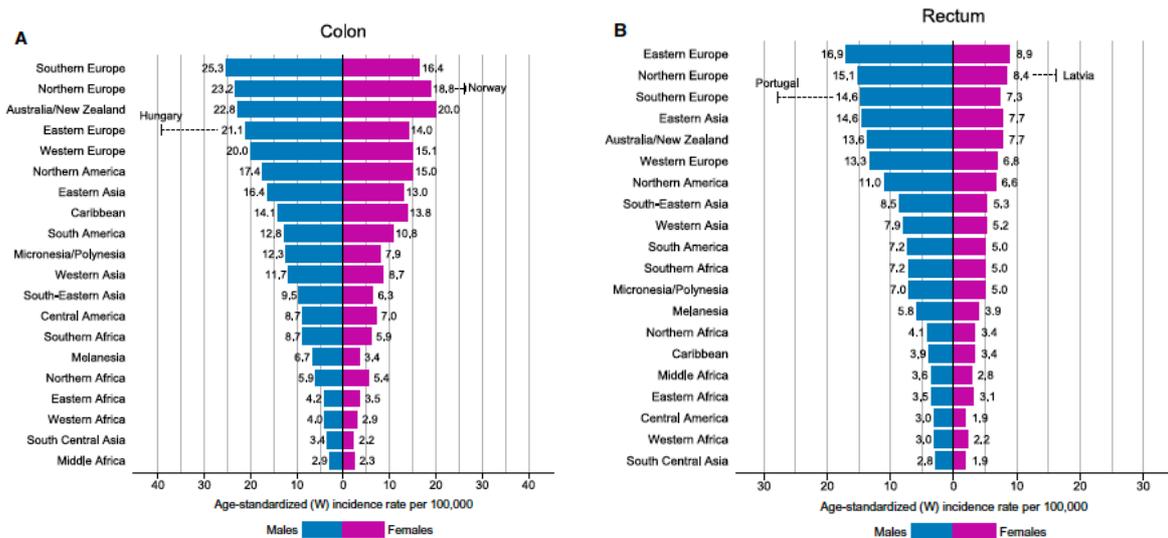


Figura 2. Datos de incidencia del cáncer de colon (izquierda), y de recto (derecha) en diferentes zonas geográficas divididos por sexos, y estandarizados por edad (Fuente GLOBOCAN 2020, ver referencia 1).

En Estados Unidos, la incidencia del CCR ocupaba también la tercera posición en frecuencia por cáncer en 2019, tanto en varones como en mujeres (9% con 78.550 nuevos casos en varones, 8% y 67.100 nuevos casos en mujeres), siendo la tercera causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos (9% con 27.640 muertes en varones, 8% con 23.380 muertes en mujeres)^{2,3}.

No obstante, y basándonos en datos de la Sociedad Americana de Oncología, el CCR ha descendido alrededor de un 30%, en los últimos 10 años, debido a la implementación de efectivas campañas de cribado poblacional⁴.

El CCR, es el tumor con mayor incidencia en España con un 13.7% de los casos, por delante del cáncer de mama (12.1%) y de próstata (11.7%); siendo la segunda causa de mortalidad por cáncer (15.64%), por detrás del cáncer de pulmón (21.62%), y por delante del cáncer de páncreas (6.87%)⁵.

1.2 CAUSAS Y FACTORES DE RIESGO

La mayoría de los tumores colorectales son histológicamente adenocarcinomas (90%), que se desarrollan desde las células del epitelio glandular de colon y recto; si bien hay que incluir otros subtipos histológicos menos frecuentes como el carcinoma escamoso, adenoescamoso, y el indiferenciado.

Aproximadamente el 60-65% de los casos de CCR son esporádicos (individuos sin una historia familiar de CCR, o sin presencia de mutaciones germinales, que incrementan el riesgo de CCR) a través de la adquisición de mutaciones genéticas somáticas genéticas, y alteraciones epigenéticas aberrantes, atribuibles a factores de riesgo ambientales⁶.

Se ha estimado que el CCR, tiene algún componente hereditario, en un 35-40% de los casos: un 25-30%, tienen una historia familiar de CCR, sin presentar un síndrome de cáncer hereditario evidente. Sólo un 5% de los casos, pueden ser atribuidos a un síndrome de cáncer hereditario (tabla 1), como el cáncer de colon hereditario no polipósico (síndrome de Lynch), o la poliposis familiar adenomatosa, causada por mutaciones genéticas en las células de la línea germinal con alta penetrancia de susceptibilidad genética (como *MLH1* y *APC*, respectivamente)⁷⁻¹⁰. Si bien los factores genéticos contribuyen a la aparición de CRC, su incidencia se ve afectada por la presencia de múltiples factores ambientales (dieta rica en grasas y carnes, sedentarismo, obesidad, hábitos enólico, tabaquismo).

En pacientes con enfermedades inflamatorias (Colitis Ulcerosa, enfermedad de Crown), se ha objetivado una incidencia de cáncer colorrectal del 1-2%.

1.3 CARCINOGENÉISIS DEL CCR

La historia natural del CCR se puede dividir en cuatro etapas: iniciación, promoción, progresión y metástasis¹¹. El proceso de iniciación envuelve a los daños genéticos y epigenéticos irreversibles en el ADN, que predisponen a las células normales a una transformación a células neoplásicas. En la etapa de promoción, las células proliferan, adquiriendo un crecimiento anormal (hiperplasia). En la fase de progresión, las células adquieren un crecimiento selectivo, conferido por las alteraciones genéticas y epigenéticas, adquiriendo características de malignidad, y con potencial metastásico (neoplasia). La última etapa de metástasis viene marcada por la diseminación de las células cancerígenas desde el órgano primario, a otros órganos o tejidos, a través de la vía sanguínea o linfática.

De forma global, el CCR esporádico, es el resultado de la acumulación de mutaciones somáticas o alteraciones epigenéticas el ADN de las células, por lo que el proceso de carcinogénesis se clasifica en tres subcategorías: inestabilidad

cromosómica (*CIN*), fenotipo metilador en islas CpG (*CIMP*), e inestabilidad de microsatélites (*MSI*)¹²⁻¹³.

Tabla 1. Listado de síndromes hereditarios en el CCR

Síndrome	Gen Mutado	Locus	Herencia	Función
FAP	<i>APC</i>	5q	AD	Inhibición de la vía WNT
HNPCC	<i>MLH1</i>	3p	AD	MMR
	<i>MSH2</i>	2p	AD	MMR
	<i>MSH6</i>	2p	AD	MMR
	<i>PMS2</i>	7p	AD	MMR
MAP	<i>MYH</i>	1p	AR	REB
Peutz-Jegher	<i>LKB1</i>	19p	AD	Serina-treoninaKinasa
Poliposis juvenil	<i>SMAD4</i>	18q	AD	Señalización TGF- β
	<i>ALK3</i>	10q	AD	Señalización TGF- β y BMPA
Cowden	<i>PTEN</i>	10q	AD	Inhibición señal AKT

Abreviaturas: FAP (Poliposis Adenomatosa Familiar), HNPCC (CCR no Polipósico), MMR (Miss matchRepair), AD (Autosómico Dominante), REB (Reparación por Escisión de Bases), AR (Autosómica Recesiva), MAP (MYH Poliposis Asociada).

El fenotipo CIN, hace referencia a las anomalías en el número de copias de los cromosomas, así como en su estructura, que provocan errores durante la mitosis celular. *CIMP* es un fenotipo asociado a modificaciones epigenéticas, que hacen referencia a la hipermetilación en regiones en el ADN de alta densidad de dinucleótidos repetitivos CG (también denominadas islas CpG), que se dan en la región del promotor de los genes supresores de tumores (tales como *MLH1*, *MINT1,2* y *3*) que silencian su expresión génica. El fenotipo *MSI* se caracteriza por la presencia de alteraciones en la longitud de los microsatélites (cortas repeticiones de nucleótidos en tándem en las secuencias de ADN)¹⁴. Su presencia es debida a una pérdida funcional de los mecanismos de reparación del MMR, siendo la hipermetilación del promotor de estos genes, la mayor causa del silenciamiento de su expresión. *MSI* y *CIMP*, presentan características fenotípicas diferentes, pero no excluyentes entre ellas.

Si hablamos del fenotipo *MSI*, es bueno, introducir, su significado tanto pronóstico, como de potencial predicción de respuesta a un tratamiento de terminado, que se abordará en apartados posteriores. Brevemente, el fenotipo *MSI*, tiene buen pronóstico en estadios de CCR localizados, pero esta misma alteración, dentro de

la enfermedad avanzada, supone un subtipo tumoral de características muy agresivas, que le hacen ser el de peor pronóstico. A nivel de práctica clínica, y en su papel en la predicción de eficacia terapéutica, los tumores en estadios localizados, sometidos a cirugía, no se benefician del tratamiento complementario adyuvante con fluoropirimidinas, e incluso su uso es perjudicial en dicha población. Si nos centramos en la población metastásica, el fenotipo *MSI*, comporta la creación de una proteína truncada, comportando la creación de gran número de neoantígenos tumorales, dando lugar a una alta carga mutacional, que les hace altamente sensibles a tratamientos con inmunoterapia.

Dentro del proceso de carcinogénesis, es clave la aparición previa de una lesión benigna, el pólipo. Estas lesiones son fácilmente visibles, y tratables endoscópicamente, y más sabiendo que precisan una media de 10 años para convertirse en un CCR. Teniendo esto en cuenta, disponemos de una ventana para la prevención del CCR.

Los dos tipos de pólipos más frecuentes como precursores del CCR son: pólipos adenomatosos, y serrados. El 85-90% de los CCR esporádicos proceden de pólipos adenomatosos; menos del 10% de éstos, progresan a CCR, y suelen ser lesiones de más de 1 cm, de alto grado de displasia, con componente veloso. Los pólipos serrados forman un grupo muy heterogéneo (hiperplásicos, adenoma sésil serrado, adenoma tradicional serrado, mixtos). Corresponden al 10-15% de los CCR esporádicos, siendo los hiperplásicos, los más prevalentes (85-90% de los casos de adenomas serrados)¹⁵.

El CRC aparece por diferentes procesos de carcinogénesis, como es la secuencia adenoma-carcinoma, mecanismo de los pólipos serrados, y por un mecanismo inflamatorio (Fig.3).

El modelo de la secuencia adenoma-carcinoma es el más frecuente, y explica la aparición del 90% CCR. En este modelo aparecen de forma gradual una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, que conllevan la transformación de las células normales en pequeños adenomas, para finalizar con la aparición de CCR. Las mutaciones inactivadoras en *APC*, un oncogén supresor de tumores, da lugar a una hiperactivación de la vía *WNT/β-Catenina*¹⁶, provocando una proliferación celular no controlada, y el desarrollo de adenomas. Subsiguientes mutaciones en el gen *KRAS*, promueven el crecimiento del adenoma, y conjuntamente con la inactivación del gen supresor *TP53*, contribuyen a la

progresión a CCR¹⁷. La secuencia adenoma-carcinoma está asociada, con el desarrollo del subtipo de CCR con inestabilidad cromosómica (CIN+).

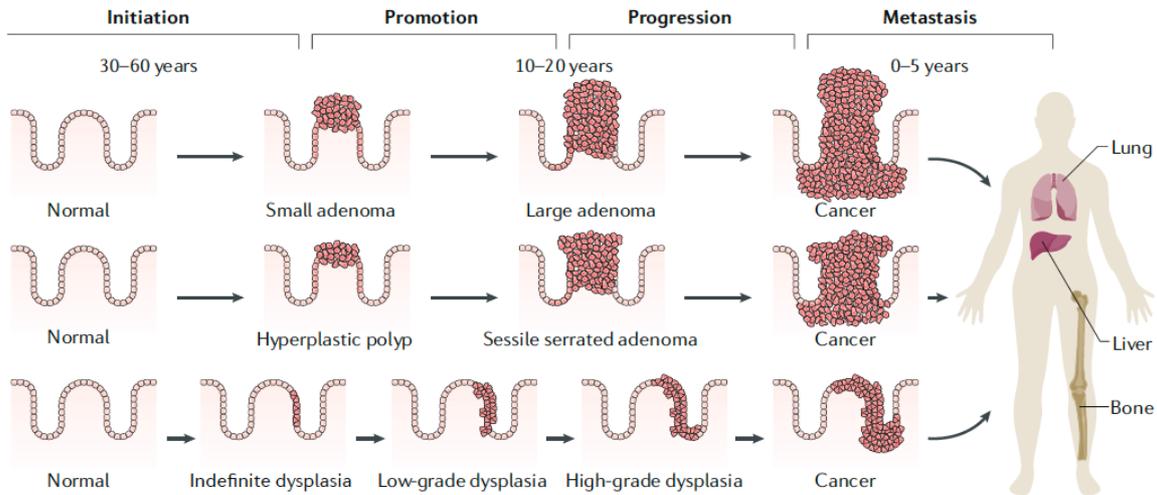


Figura 3. Vías de carcinogénesis del CCR (referencia 16). Secuencia Adenoma-carcinoma (85-90% CCR esporádicos con alto CIN) en la fila superior. Vía serrada (10-15% CCR esporádico con alto CIMP) en la fila central. Vía inflamatoria (menos del 2% del CCR) en la fila inferior.

La carcinogénesis por vía serrada se caracteriza por la progresión de células normales a pólipo hiperplásico, adenoma sésil serrado, para acabar en una neoplasia. En esta vía, la presencia de la mutación en el oncogen *BRAF*, es un evento precoz y fundamental, que induce una proliferación descontrolada, a través de la activación constitutiva de la vía MAPK. La presencia de fenotipo CIMP, promueve la progresión de adenomas serrados sésiles a adenocarcinomas, evidenciándose hasta en un 90% de los adenomas serrados la presencia de CIMP¹⁸⁻²⁰. Las mutaciones en *BRAF* han emergido en los últimos años, en diversos tumores, como un factor de mal pronóstico, y también como factor predictivo positivo de eficacia al tratamiento con inhibidores de *BRAF*. Su presencia en CCR, supone un subgrupo de pacientes con tumores altamente agresivos, con un patrón de diseminación distinto al habitual, y con pobre respuesta a los agentes quimioterápicos habituales.

Finalmente, se ha sugerido una tercera vía de carcinogénesis, que es la que envuelve a todos los procesos de inflamación intestinal crónica, y particularmente a la colitis ulcerosa, dónde el riesgo de padecer CCR, es 3-4 veces mayor que en la población general, pudiendo explicar, no obstante, menos del 2% de los CCR. En este subgrupo de pacientes, partimos de una mucosa no displásica, sin presencia de pólipos, pasando a un bajo grado, y posteriormente a un alto grado

de displasia, hasta la formación de un CCR. El tiempo, y la frecuencia de eventos moleculares, difiere en gran medida, de las otras dos vías de carcinogénesis: aparición temprana de mutaciones en *P53* (70% de los casos), infrecuente la presencia de mutaciones en *APC* (13%), y cuando aparecen, de forma muy tardía²¹⁻²².

1.4 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN

La sintomatología de debut del CCR es en la mayoría de los casos muy inespecífica, y va a depender principalmente de la localización del tumor primario. Así, en los tumores de colon derecho, predominan los síntomas de un síndrome tóxico (pérdida de peso, anorexia, astenia), y van acompañados de una anemia ferropénica crónica. Sin embargo, los tumores de colon transverso e izquierdo se manifiestan con alteraciones del cambio de ritmo deposicional (estreñimiento o diarreas), rectorragias, dolor abdominal cólico, e incluso debutan con un cuadro de oclusión intestinal.

El diagnóstico se realiza mediante una colonoscopia completa, que debe visualizar desde el recto hasta el colon derecho., con biopsia de la lesión primaria. En las situaciones dónde es imposible franquear la tumoración, se deberá repetir, en los 3-6 meses posteriores a la cirugía del tumor primario. Se puede precisar de un enema opaco, en los casos que se diagnostican con oclusión intestinal.

De forma conjunta a la evaluación clínico-radiológica, se realiza una evaluación patológica de la enfermedad. La metodología de clasificación más usada en el diagnóstico de CCR, es el TNM de la UICC²³ (International Union Against Cancer), y posteriormente adaptada por la AJCC²⁴ (American Joint Committee on Cancer). Las características de cada estadio de la enfermedad, y su correspondencia con otros métodos de estadificación se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Estadificación del CCR (Basado en AJCC, 8ª edición, 2017)

Estadio.	EI	EII	EIII	EIV
E TNM.	T1N0M0. T2N0M0	A T3N0M0 B T4aN0M0 C T4bN0M0.	A T1-2N1M0 T1N2aM0 B T3-T4aNN1/N1cM0. T2-T3N2aM0 T1-T2NabM0 C T4aN2aM0 T3-T4aN2bM0 T4bN1-N2M0	A TnNnM1a B TnNnM1b C TnNnM1c
Descrip.	T1 inv. submucosa T2 inv. muscular.	T3 Inv. tejperirectal T4a Inv peritoneo visceral T4b Inv órganos adyacentes.	N1 1-3 ganglios afectados N1a 1 ganglios + N1b 2-3 ganglios + N1c depósitos suberosa N2 4 o mas ganglios N2a 4-6 ganglios + N2b 7 o mas ganglios +	M1 Metástasis en uno o + órganos M1a Mets en 1 órgano M1b Mets en dos o más órganos M1c Mets en peritoneo
Tratamiento.	Cirugía	Cirugía+/- Quimioterapia	Cirugía y Quimioterapia	Quimioterapia +/- Cirugía
SG 5 años.	93%	A 85% B 72% C 62%	A 83% B 64% C 44%	8-9%
E. Dukes	A	B	C	D
E ACM	A/B1	B2-B3	C1,2,3	

Abreviaturas: inv. (invasión), E (estadio), SG (supervivencia global), tej (tejido), Mets (Metástasis)

1.5 FACTORES PRONÓSTICO DEL CCR

De la misma manera que definimos al CCR como una neoplasia heterogénea, existen múltiples factores que van a inferir en el pronóstico de ésta. Así, los podemos subclasificar dependiendo de: estado del paciente, estadio histopatológico tumoral, actuación de un equipo multidisciplinar, y presencia de marcadores moleculares e inmunológicos. También intervienen los factores dependientes del paciente: principalmente edad, sexo, comorbilidades y nivel socioeconómico.

En referencia a la edad, un 44% de casos de CCR, se diagnostican en edades superiores a los 75 años, presentando un pico entre los 85-89 años, probablemente debido a la acumulación de mutaciones, y pérdida de funcionalidad del sistema inmune. En la toma de decisiones médicas, se debería tener en cuenta el estado de salud global y las comorbilidades del paciente, en detrimento a la edad, biológica, ya que ésta, es un factor limitante a la hora de tratar de forma onco-específica estos pacientes, teniendo una pobre representación en los estudios clínicos²⁵.

En cuanto al sexo, las mujeres presentan mayor incidencia de tumores de colon derecho, con fenotipo MSI, teniendo una mejor supervivencia, vinculada al efecto protector de los estrógenos, pero no conociéndose muy bien su mecanismo de acción.

Las comorbilidades representan un importante factor pronóstico en el CCR, no sólo por el incremento de riesgo de muerte por causas no oncológicas, sino por la influencia en la mortalidad específica por cáncer. Existen varias escalas para medirlas, como los Criterios de Charlson, o el *Performance status* (PS).

El nivel socioeconómico es un marcador pronóstico, más que un factor pronóstico. Los pacientes con pobre nivel socioeconómico presentan múltiples comorbilidades, dieta pobre, y debutan con enfermedades avanzadas.

Por otro lado, la experiencia del equipo quirúrgico es fundamental en el pronóstico del CCR. Se ha demostrado que la alta calidad quirúrgica, con una cirugía estandarizada, tanto del colon como del recto, tiene un efecto beneficioso en la supervivencia de estos pacientes²⁶.

Respecto al diagnóstico patológico, la información macro y microscópica del tumor, es la base del tratamiento del CCR localizado, definido bajo el estadio TNM de las previamente mencionadas AJCC y UICC. Comprende información sobre el crecimiento del tumor, su diseminación a los ganglios linfáticos, o la formación de depósitos metastásicos. Las características histopatológicas que se consideran factores pronósticos independientes son: la profundidad de invasión de la pared intestinal, el grado de diferenciación tumoral, la invasión perineural, la angiolinfática, la invasión extramural venosa, los depósitos extramurales tumorales y el *budding* tumoral, entendido como las células tumorales que infiltran de forma individual²⁷.

Se han incorporado como pronósticos diferentes factores moleculares que se enumeran a continuación:

- Oncogenes: mutaciones en los genes que codifican para *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *TGF-β*, *EGFR*, *c-ERB2*, *c-MYC*
- LOH 18q: pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 18
- Alteraciones en genes supresores tumorales: *p53*, *APC*, *DCC*, *MCC*, *p27*.
- Alteraciones en genes reparadores de ADN: genes del MMR (fenotipo MSI)
- Alteraciones en vías de apoptosis: genes *BCL-2*, *BAX*, *P53*
- Angiogénesis/metástasis/proliferación: TP, VEGF, MMPs, E-Cadherina, CD44
- Alteraciones en dianas terapéuticas: TS, DPD, DHFR, GARFT, Topo I...

Se ha de destacar la presencia de mutaciones en los oncogenes *KRAS*, *PIK3CA* y *BRAF*, derivados de la acumulación de mutaciones y, desregulación temprana de la vía *APC/WNT*, siendo factores de peor supervivencia, al contrario de los casos con fenotipo MSI, que son pacientes con buen pronóstico en la enfermedad localizada²⁸. La presencia de mutaciones en la vía de MAPK, si bien son pronósticas, no tiene utilidad en la práctica clínica en la enfermedad localizada, en referencia a la selección de tratamiento, pero si como factores predictivos negativos en la enfermedad avanzada, y el uso de anticuerpo monoclonales contra el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), como se comentará posteriormente.

En referencia a la presencia de inestabilidad de microsatélites (MSI), este fenotipo, no sólo es un factor de buen pronóstico en la enfermedad localizada, sino que en el estadio II, tiene un papel como factor predictivo negativo de eficacia de las fluoropirimidinas²⁹. Sin embargo, en enfermedad avanzada, MSI, es factor de mal pronóstico, pero factor predictivo de respuesta a inmunoterapia.

Por otro lado, el estado inmunológico de un paciente con CCR, tiene un significativo impacto en su pronóstico. Un marcador de inflamación es la ratio neutrófilos /linfocitos (NLR), dónde un incremento de NLR, está asociado con linfocitopenias y neutrofilia; la linfocitopenia denota un fallo de la inmunidad celular, y la neutrofilia se ve en procesos de respuesta inflamatoria aguda, por lo cual, un aumento de NLR, indica un proceso de respuesta de inflamación sistémica, y está asociado con mal pronóstico³⁰. Dentro de las múltiples células inmunes que se encuentran infiltradas en los tumores, los altos niveles de infiltrados linfocitarios están asociados con una mejora en supervivencia. Estos infiltrados pueden ser

detectados por técnicas de inmunohistoquímica, diferenciando CD3, CD4, CD8 y FOXP3. Los estudios han mostrado que la baja densidad de CD3 y CD45R0, tanto en el centro como en margen invasivo del tumor, con independencia del estadio tumoral, tienen una peor supervivencia global similar al estadio IV³¹.

1.6 TRATAMIENTO DEL CCR

En oncología, para garantizar el mejor manejo de la enfermedad, éstas son abordadas desde diferentes disciplinas, dando lugar a equipos de tratamiento multidisciplinarios. En el caso del CCR, el equipo debe estar compuesto por cirugía, oncología médica, gastroenterología, oncología radioterápica, radiología, anatomía patológica y patología molecular.

El seguimiento conjunto por un equipo multidisciplinar está asociado con unas tasas de reducción en la incidencia de márgenes circunferenciales positivos para cáncer de recto, un incremento de las tasas de tratamiento adyuvante en cáncer de colon, así como de cirugía de metástasis en pacientes con estadio IV de CCR.

1.6.1 CIRUGÍA EN EL CCR

El tratamiento del cáncer de colon, y el de recto, difieren tanto en el tratamiento preoperatorio, como en el tratamiento quirúrgico, y en los tratamientos adyuvantes posteriores.

El tratamiento estándar del cáncer de recto es la escisión mesorectal, es decir, la exéresis del recto, conjunta con el tejido mesorectal que le envuelve³², y la fascia mesorectal. Esta escisión, es fundamental, porque contiene la mayoría de los ganglios linfáticos, así como los depósitos tumorales. Es de valor pronóstico obtener un margen lateral, o circunferencial libre de enfermedad (definido como la distancia mayor de 1 mm desde el borde del tumor, y el margen de cirugía), dado que su afectación aumenta el riesgo de recaída local, y de metástasis a distancia. Se han desarrollado otras técnicas paralelas como la cirugía transanal, la microcirugía endoscópica transanal (TEM), y la cirugía laparoscópica, que disminuyen la agresividad de la propia cirugía, y muestran una recuperación más temprana de los pacientes³³.

En el cáncer de colon localizado, la cirugía del tumor, así como de los ganglios linfáticos loco-regionales, es el estándar de tratamiento. La extensión de la cirugía viene predeterminada por la localización del tumor primario, y por la disposición de

la vascularización³⁴. La cirugía del colon puede ser abierta, o por vía laparoscópica, mostrando ambas técnicas, unos resultados similares en cuanto a eficacia, tras la publicación de varios metanálisis³⁵.

1.6.2 RADIOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE RECTO

La radioterapia no tiene un papel definido en el cáncer de colon. Contrariamente, tiene un papel fundamental, reduciendo la recurrencia local, y aumentando las tasas de supervivencia en pacientes con cáncer de recto. Tradicionalmente, el tratamiento complementario postcirugía (adyuvancia) con radio-quimioterapia, ha sido considerado el tratamiento estándar para los pacientes con cáncer de recto estadio II y III³⁶; pero es a partir de los estudios publicados entre 2001-2004, que se aconseja a estos pacientes, ser tratados con radio-quimioterapia antes de la cirugía (neoadyuvancia), basándose en el mejor control local de la enfermedad, y la menor morbilidad. Dentro del estudio clínico CKVO 95-04, se comparó la cirugía (escisión total del mesorecto) con la cirugía combinada con radioterapia preoperatoria corta (5 x 5 Gy)³⁷, mostrando después de un seguimiento a dos años, unas tasas de recurrencia local del 2.4% en el grupo tratado con radioterapia, frente a un 8% en grupo control, sin objetivarse diferencias en la supervivencia. El otro estudio clínico pivotal, en el que se basa la radio-quimioterapia preoperatoria, es el estudio alemán CAO/ARO/AIO-94, dónde se compara la administración de radio-quimioterapia preoperatoria, con la administración postoperatoria convencional (50.4 Gy concomitante con 5-Fluorouracilo en 5 semanas) en pacientes con cáncer de recto.

operable (T3/4 y/o N+)³⁸, mostrando tasas de recurrencia del 6% frente al 13%, respectivamente (p=0.006). La presencia de metástasis a distancia, así como la supervivencia global, eran similares en los dos grupos, siendo el tratamiento preoperatorio menos tóxico.

Recientemente se han introducido dos nuevos conceptos dentro del tratamiento preoperatorio del cáncer de recto: Neoadyuvancia total y preservación de órgano. El concepto de la neoadyuvancia total, es incluir la radioterapia corta, y quimioterapia de forma secuencial de forma preoperatoria a cualquier cirugía del recto. Recientemente se han presentado dos ensayos clínicos (Rápido, Prodiges 23), con resultados prometedores en supervivencia libre de recaída³⁹⁻⁴⁰. A la espera de datos maduros de supervivencia global, se podría verificar que esta modalidad

de terapia se incorporará como tratamiento estándar en el cáncer de recto localmente avanzado.

La preservación de órgano (*watch and wait*)⁴¹, consiste en cumplimentar el tratamiento habitual de quimio-radioterapia preoperatoria, y en los pacientes que se consigue una respuesta completa radiológica visualizada por resonancia magnética, y una vez verificada la respuesta, tanto por exploración física (tacto rectal), como por rectoscopia con biopsia múltiples a ciegas, se le somete a controles estrictos, de RM, Tac, colonoscopia y tacto rectal, sin someterlos a cirugía. Aunque los datos son retrospectivos, y de grupos de pacientes muy heterogéneos, los resultados son prometedores y robustos, con datos de supervivencia libre de recaída superiores al tratamiento habitual. Por tanto, de forma similar que en el caso de la neoadyuvancia total, puede implantarse en un futuro inmediato, como una alternativa al tratamiento convencional

1.6.3 TRATAMIENTO SISTÉMICO DEL CCR AVANZADO

En los últimos 15 años, se ha incorporado nuevos fármacos para el tratamiento del CCR avanzado, tanto quimioterápicos, como anticuerpos monoclonales, que han derivado en un beneficio claro en supervivencia global. La opción de la administración de 5-Fluorouracilo (5-FU) en monoterapia, ha sido substituida por la poliquimioterapia, es decir, combinaciones de dos o tres fármacos con la incorporación de los nuevos agentes (oxaliplatino, irinotecan, capecitabina)⁴²⁻⁴⁴, y con la combinación de los llamados fármacos biológicos anti diana, que van dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cetuximab y panitumumab, o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), como bevacizumab, aflibercept y ramucirumab. La combinación de la poliquimioterapia con anticuerpos monoclonales, han contribuido en la mejoría del pronóstico del CCR de forma global⁴⁵⁻⁴⁹.

1.6.3.1 NEOADYUVANCIA EN EL CÁNCER DE COLON LOCALIZADO

El tratamiento neoadyuvante del cáncer de colon localizado, a día de hoy, es un tema de debate a nivel investigacional.

El tratamiento estándar es la exéresis completa oncológica del tumor primario, seguida de tratamiento quimioterápico adyuvante. Con esta aproximación, la tasa de cirugía radical R0, oscila entre el 40 y 90%⁵⁰⁻⁵¹, siendo la supervivencia a los 5

años del 28 al 70%. Con estos resultados, y viendo que en la mayoría de los tumores digestivos (recto, gástrico, esófago) la neoadyuvancia es un esquema estándar habitual, se ha planteado su uso en tumores localizados de colon. Se entiende por CCR localizado, aquellos tumores T3 de alto riesgo (que invaden más de 5 mm la capa muscular), y T4 (penetran en el peritoneo visceral, invaden órganos o estructuras adyacentes).

Los resultados vienen refrendados por estudios Fase II, y datos retrospectivos procedentes de largas bases de datos de grupos cooperativos⁵²⁻⁵⁴, que denotan que los pacientes T4b, tratados de forma neoadyuvante, presentan una disminución significativa del riesgo de recaída; estando pendiente resultados prospectivos procedentes de estudios randomizados Fase III.

Si bien, como hemos comentado previamente, la neoadyuvancia sobre los tumores de colon localizado es meramente investigacional, la neoadyuvancia sobre los tumores de recto, se aplica en la práctica clínica actual. No me extenderé en este apartado, dado que ya se incluyó la evidencia de ésta, en el apartado de tratamiento con Radioterapia en el CCR⁵⁵⁻⁶¹.

1.6.3.2 ADYUVANCIA EN EL CÁNCER DE COLON LOCALIZADO

La introducción de la quimioterapia adyuvante como tratamiento complementario a la cirugía curativa, ha permitido incrementar incrementar el intervalo libre de recaída de la enfermedad, y la supervivencia global, de los pacientes con cáncer de colon, ya que la enfermedad microscópica o micrometastásica no acostumbra a ser perceptible, y este tratamiento postoperatorio ayuda a prevenir la recurrencia. Aunque en los estudios clínicos⁶², se ha observado un claro beneficio del tratamiento adyuvante en los pacientes con CCR estadio III, el valor potencial en estadios II es controvertido.

La quimioterapia adyuvante actual está basada en la combinación FOLFOX (5-Fluorouracilo en infusión continua y oxaliplatino), basado en el estudio MOSAIC, que comparaba la eficacia de FOLFOX4 frente 5FU IC, en estadios II y III, y dónde se demostró una mejoría significativa en supervivencia libre de recaída a los 4 años con FOLFOX (69.7 frente 61%), con una reducción del riesgo relativo de recaída a los 4 años del 25%⁶³⁻⁶⁵.

Por otro lado, también se ha valorado la incorporación de Irinotecan (CPT-11), dentro del estudio PETACC3/V-307, en pacientes con CCR estadio III, teniendo

que pararse el ensayo prematuramente, por las elevadas toxicidades derivadas del CPT-11 en la adyuvancia⁶⁶.

También se ha valorado la incorporación de la Capecitabina (CAPE), pro-droga oral del 5FU, en los regímenes de adyuvancia, por la comodidad que comporta al paciente, por su forma de administración oral. El estudio X-ACT, que comparaba en pacientes estadio III, la CAPE frente al esquema de la Clínica Mayo (5FU en bolus), demostró, similar eficacia en los dos tratamientos, con menor aparición de efectos adversos de forma significativa con CAPE⁶⁷. En el mismo contexto anterior, se ha comparado dentro del estudio NO 16968, se mostró un de la combinación XELOX (CAPE + Oxaliplatino) en supervivencia, tanto libre de progresión como global⁶⁸, posicionando a este esquema como otra opción terapéutica en la adyuvancia de colon.

Se ha valorado el potencial papel en la adyuvancia de los anticuerpos monoclonales, cetuximab, y bevacizumab, mediante los estudios PETACC8 y AVANT, respectivamente, en pacientes con CCR localizado, no mostrando ningún beneficio añadido al esquema clásico de quimioterapia⁶⁹⁻⁷⁰.

Aunque en los estudios clínicos, se ha observado un claro beneficio del tratamiento adyuvante en estadios III, el valor potencial en estadios II, es controvertido. Por tanto, en estadios II, el tratamiento adyuvante sólo está indicado en pacientes con algún factor de mal pronóstico, siendo el tratamiento de elección el esquema de 5FU IC o la CAPE en monoterapia.

1.6.3.3 TRATAMIENTO DEL CCR CON ENFERMEDAD AVANZADA

El esquema del tratamiento en la enfermedad avanzada o metastásica puede ser variable, dependiendo de objetivo que se quiera alcanzar. Así podemos definir dos grandes objetivos: 1) enfermedad metastásica potencialmente abordable quirúrgicamente (30%), dónde la finalidad va a ser intervenir al paciente, con intención curativa. 2) enfermedad metastásica no operable (70%), dónde se procederá a realizar un tratamiento meramente paliativo.

1.6.3.3.1 NEOADYUVANCIA EN CCR METASTÁSICO

El objetivo de la neoadyuvancia en estos casos potencialmente operables (30% CCR metastásico) es la cirugía de las metástasis hepáticas; obtener una cirugía R0 con intención curativa.

Dentro de esta población, un 10% de casos presentan enfermedad metastásica hepática operable de entrada, no estando muy claro el beneficio del tratamiento con quimioterapia perioperatoria⁷¹, si bien, en pacientes con factores de mal pronóstico (enfermedad voluminosa, contacto vascular), se recomienda el uso de la neoadyuvancia, es decir tres meses con FOLFOX4, y completar de forma adyuvante ⁷² tras la cirugía (Fig. 4a).

El 90% de casos son potencialmente operables, dónde se podría realizar una cirugía de entrada, pero por criterios de mal pronóstico (número de lesiones hepáticas, tamaño de estas, mala localización o contacto vascular, dificultad de obtener una cirugía radical), se requiere de iniciar un esquema de quimioterapia neoadyuvante.

En este contexto, se ha de considerar el esquema más activo, es decir, el que aporte la mayor tasa de respuestas, dado que ésta, se correlaciona directamente con la tasa de cirugía de metástasis⁷³⁻⁷⁴.

En este sentido, combinaciones con FOLFOX y FOLFIRI (5-FU con irinotecan) con anticuerpos monoclonales anti-EGFR o poliquimioterapia con tripletes, (FOLFOXIRI), aportan tasas de respuesta en pacientes con enfermedad limitada al hígado del 70%, con tasas de cirugía del 40%⁷⁵⁻⁷⁷, y supervivencias del 40% a los 5 años (Fig. 4c y d).

1.6.3.3.2 TRATAMIENTO DEL CCR CON ENFERMEDAD NO OPERABLE

La enfermedad no operable de entrada corresponde al mayor porcentaje de casos de CCR metastásico (70%), dónde entre un 8-10% de los casos, van a poder ser finalmente intervenidos, tras una quimioterapia intensiva de conversión, con largos supervivientes a largo plazo; pero la mayoría recibirán un tratamiento meramente paliativo, con medianas de supervivencias inferiores al 13% a los 5 años, dónde el objetivo es aportar al enfermo la mejor supervivencia, con la mejor calidad de vida (Fig. 4b).

El tratamiento de la enfermedad metastásica ha variado en los últimos 20 años, pasando de la monoterapia basada en 5-FU en monoterapia, con medianas de supervivencia de 12 meses, a esquemas de poliquimioterapia basados en la combinación de oxaliplatino, irinotecan con fluoropirimidinas (FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI, XELOX, XELIRI) con la adición de anticuerpo monoclonales anti-EGFR o anti-VEFG, alcanzando medianas de supervivencia de 30-35 meses⁷⁸⁻⁸⁰.

Dentro de la variabilidad de estos esquemas, la selección viene determinada por factores relacionados con la enfermedad (volumen de enfermedad, sintomatología clínica, afectación visceral, estado de mutación en RAS, tratamientos previos de adyuvancia) y con el paciente (preferencias, comorbilidades...).

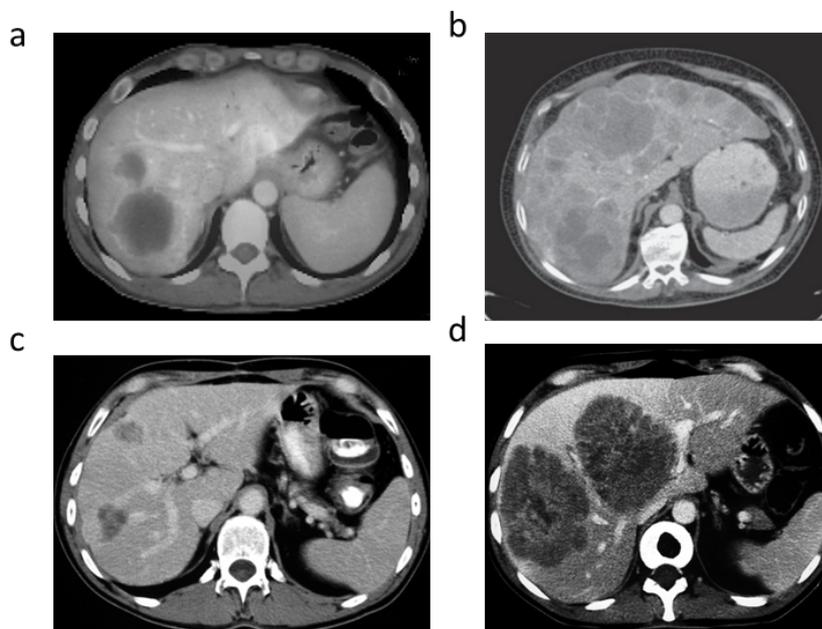


Figura 4. Imágenes de TAC abdominal de neoplasias de colon con: a) dos lesiones hepáticas, catalogado dentro de grupo de enfermedad operable; b) afectación hepática voluminosa bilobar con enfermedad irresecable, que, d) tras realización de quimioterapia de conversión, se objetiva una respuesta parcial de las lesiones hepáticas, y por tanto enfermedad operable; c) afectación hepática difusa, irresecable por definición.

La **primera línea** de tratamiento, es decir, pacientes nativos de cualquier tratamiento sistémico, son los esquemas de combinaciones de dos agentes quimioterápicos mencionados previamente, con un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (cetuximab o panitumumab) o anti-VEGF (bevacizumab, aflibercept o ramucirumab)⁸¹⁻⁹⁸.

Como hemos comentado previamente, la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* es marcador predictivo negativo de respuesta a los agentes anti-EGFR⁹⁹. Por lo que se recomienda determinarlo en el momento diagnóstico.

De forma genérica la primera línea de tratamiento para enfermedad metastásica con independencia del esquema utilizado aporta tasas de respuestas entre 45-58%, supervivencia libre de progresión de entre 9-11 meses, y una mediana de supervivencia de 24 meses¹⁰⁰⁻¹⁰⁹.

La **segunda línea** de tratamiento, administrada a la progresión de la primera línea, va a depender del esquema usado previamente. Por tanto, si un paciente inició

tratamiento con FOLFOX, en la segunda línea será tributario de un cambio a FOLFIRI, con un anticuerpo monoclonal diferente al que se usó en primera línea de tratamiento¹¹⁰⁻¹¹⁴.

De forma global, la actividad de la segunda línea es menor que la primera, mostrando tasas de respuestas que oscilan entre el 10% y 20%, con una mediana de supervivencia libre de progresión de 4-6 meses¹¹⁵.

La **tercera línea** de tratamiento se basa en la elección entre tres diferentes agentes: agentes anti-EGFR (cetuximab y panitumumab), regorafenib y lonsurf. Los primeros han mostrado su actividad en monoterapia, en pacientes refractarios a dos líneas de quimioterapia, con medianas de supervivencia libre de progresión de 12 semanas¹¹⁶⁻¹¹⁹.

Regorafenib es un inhibidor proteína quinasa con actividad en la angiogénesis (VEFR1-3, TIE2), la oncogénesis (*RET*, *RAF*, *BRAF*, *KIT*), y en el microambiente tumoral (PDGFR, FGFR). El estudio pivotal fase III (CORRECT), que comparó a doble ciego el uso de regorafenib, frente al mejor tratamiento de soporte. El estudio mostró un beneficio en supervivencia, sin poderse identificar biomarcadores séricos predictivos de beneficio de su uso¹²⁰.

Lonsurf (trifluridina/tipiracilo), está compuesto por un agente análogo del nucleósido timidina, la trifluridina, y el inhibidor de la timidina fosforilasa, el tipiracilo hidrocloreto. En el ensayo fase III RECURSE, que comparó la eficacia de Lonsurf frente a placebo, en CCR metastásico que habían progresado a varias líneas de tratamiento, demostró un beneficio en supervivencia global de dos meses, con una reducción del riesgo de muerte del 31%¹²¹.

1.6.4 FACTORES MOLECULARES PRONÓSTICO PREDICITVOS DE EFICACIA PARA LA SELECCIÓN DE TRATAMIENTO

A partir de los estudios de investigación translacional, se han descubierto nuevas dianas terapéuticas, que han sido objeto de su desarrollo a nivel clínico.

La población con mutaciones en *BRAF* supone un 8% de los casos de CCR avanzados, y es un factor de mal pronóstico a corto plazo. Se diseñó un estudio fase III (BEACON), dónde se randomizaron 1:1:1, a más de 600 pacientes con CCR avanzado en progresión a una, o dos líneas de tratamiento, a tres brazos: encorafenib (inhibidor *BRAF*) con binimetinib (Inhibidor *MEK*) y cetuximab vs encorafenib-binimetinib, con una rama control de quimioterapia

(FOLFIRI+cetuximab o irinotecan con cetuximab). Se demostró un beneficio de supervivencia global en los brazos experimentales frente a la quimioterapia (9.3 meses vs 9.3 vs 5.9), con una mediana de seguimiento de 13 meses¹²². Por tanto, los casos BRAF mutados son candidatos para recibir terapia basada en la combinación de inhibidores de BRAF y agentes anti-EGFR postulándose, la mutación en BRAF, como un factor predictivo positivo de eficacia de tratamiento. En el caso de los pacientes con tumores fenotipo MSI, con enfermedad localizada tienen un buen pronóstico. No obstante, estos casos, en la recaída, se transforman en un subtipo altamente agresivo, y de peor pronóstico. Interesantemente, en estos casos de CCR con fenotipo MSI (4%), éste se ha postulado como un factor predictivo positivo de eficacia de tratamiento con inmunoterapia. La demostración de este beneficio proviene de un estudio fase III con más de 300 pacientes con CCR avanzado con fenotipo MSI, nativos de tratamiento, en el que se comparó el tratamiento con el agente inmunoterápico pembrolizumab, frente al mejor esquema de tratamiento quimioterápico. Los resultados mostraron un beneficio en supervivencia libre de enfermedad a los 3 años (42% vs 11% HR 0.59), y también una mejor supervivencia global a los 3 años (61% versus 50%; HR 0.74). Con estos resultados la EMA, aprobó el uso de pembrolizumab en primera línea de tratamiento en CCR avanzado con fenotipo MSI¹²³.

Adicionalmente, aunque con datos menos maduros, se dispone de otras dianas terapéuticas como *HER-2*, *KRAS G12C* y *NTKR*, cuyas alteraciones actúan como factores predictivos de eficacia a sus propios inhibidores o a otros agentes, que podrían abrir un nuevo abanico de posibilidades terapéuticas en pacientes con CCR avanzado.

Así se ha visto que, en pacientes con CCR avanzado, refractarios a varias líneas de tratamiento, y que presentan la amplificación en el gen que codifica para *HER-2* (3-4% del CCR), obtienen tasas de respuestas de entre 30% al 50% a inhibidores de HER2, con medianas de supervivencia que van desde los 11 a 25 meses.

Actualmente se encuentran en desarrollo los inhibidores de *KRAS* con la mutación *G12C*. A pesar de que la mutación *G12C* se da en baja frecuencia en CCR (4%), los estudios clínicos fase I dirigidos a CCR que recibieron estos inhibidores (sotorasib, adagrasib), han mostrado una alta tasa de estabilizaciones, con mínima toxicidad; hecho que ha llevado a que estos se combinen con quimioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia en ensayos clínicos fase II-III¹²⁴.

2.1 BIOMARCADORES EN ONCOLOGÍA

Los biomarcadores son parte de las nuevas herramientas usadas en el campo de la oncología de precisión. Se clasifican en tres formas según su naturaleza, y las técnicas de detección usadas: biomarcadores moleculares, biomarcadores celulares, y biomarcadores de imagen¹²⁵. Los tres tipos de marcadores poseen un rol clínico en la medicina de precisión, y guía de tratamientos, y según su aplicabilidad en oncología se pueden subcaracterizar como predictivos, pronósticos o diagnósticos.

Biomarcadores Predictivos: sirven como métodos para predecir los resultados clínicos. Son usados para optimizar tratamientos, seleccionando el más adecuado según las características del paciente o la patología. En muchas ocasiones son biomarcadores moleculares, que consisten en proteínas situadas en vías de señalización relacionadas con procesos patológico-específicos, y en los mecanismos de acción de fármacos, y son prometedores para capturar aspectos que permiten la evaluación de la respuesta individual al tratamiento¹²⁶. Esto ofrece una aproximación dual, tanto a la observación de tendencias en estudios retrospectivos, como al uso de biomarcadores para predecir resultados. Por ejemplo, los biomarcadores predictivos usados en CCR, pueden servir como una forma de mejorar las tasas de progresión y supervivencia de los pacientes, y en el caso individual, para evitar la administración de tratamientos no eficaces, pueden servir como una forma de liberar a los pacientes de una toxicidad innecesaria¹²⁷.

Algunos ejemplos comunes de biomarcadores predictivos de tipo molecular asociados a la eficacia de un tratamiento específico son: la proteína de fusión BCR-ABL en leucemia mieloide crónica tratada con diversos inhibidores de tirosina quinasa, mutaciones *c-KIT* en tumores GIST tratados con imatinib, mutaciones en el dominio tirosina-quinasa de EGFR en cáncer de pulmón no célula pequeña, tratados con inhibidores de EGFR, y amplificaciones en el gen HER2 en relación al tratamiento con trastuzumab, o mutaciones en BRAF con el tratamiento con inhibidores de BRAF, principalmente en melanoma¹²⁸.

Biomarcador diagnóstico: sirven para afinar diagnósticos que pueden ser significativamente más específicos para cada paciente.

Puede ser un elemento biológico, cuya detección indica un estado particular de una enfermedad, como la presencia de un anticuerpo para indicar una infección¹²⁹. Más específicamente, en oncología serían aquellos cambios moleculares que indican la presencia de neoplasia, y que permiten subclasificarla de forma detallada, para poder ser tratada con mayor precisión.

El ejemplo más común es el antígeno prostático específico (PSA), que puede ser medido como un indicador del tamaño de la próstata, cuyos cambios rápidos, son potenciales indicadores de cáncer. Otro ejemplo es la determinación del estado de inestabilidad de microsatélites en CCR, o la detección de la expresión de receptores hormonales, de estrógenos o progesterona, así como amplificaciones en HER2, en el cáncer de mama. En un caso más extremo, la detección de proteínas mutadas, propias de una neoplasia, en individuos aparentemente sanos mediante una monitorización en sangre, puede ser usada como un biomarcador de diagnóstico precoz de la presencia de una neoplasia, pues las proteínas mutadas probablemente puedan provenir de un tumor existente¹³⁰.

Biomarcadores pronósticos: estos proveen información acerca de la agresividad de la enfermedad, pudiendo predecir el curso de un paciente, independientemente de la terapia utilizada. Un ejemplo es la detección de HER2, y receptores hormonales como factores de mal, y buen pronóstico respectivamente en cáncer de mama.

Los biomarcadores para medicina de precisión son una parte relativamente nueva de las herramientas utilizadas. No obstante, la falta de datos más allá de estudios retrospectivos, y de aproximaciones exitosas con biomarcadores han sido señaladas como las causas principales de la necesidad de nuevos estudios sobre biomarcadores dentro del campo médico.

2.2 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR

El CCR es un grupo heterogéneo de neoplasias que tienen lugar en un mismo órgano. Se caracteriza por tener diferentes vías de carcinogénesis, lo cual da lugar a una enfermedad heterogénea, con diferentes subtipos, con una gran variabilidad genética y epigenética, reflejando diversos patrones histopatológicos, así como clínicos.

Recientemente se han publicado dos nuevas clasificaciones moleculares dentro del CCR. La primera, está basada en un análisis molecular integrado en el proyecto “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA), y la segunda clasificación es la propuesta por el Consorcio del Consenso de Subtipos Moleculares (CMS). Estas han supuesto un gran avance, no sólo en el conocimiento evolutivo, sino también un primer paso en la búsqueda de biomarcadores y, por tanto, en la mejor clasificación y selección de la mejor opción terapéutica en cada caso.

2.2.1 CLASIFICACIÓN MOLECULAR BASADA EN EL TCGA

La clasificación de la TCGA está basada en una caracterización genómica, epigenómica y transcriptómica de muestras de pacientes con CRC, usando tecnologías de alto rendimiento, como microarrays, y secuenciación masiva de nueva generación (NGS)¹³². Esta clasificación divide en tres grupos al CRC:

1) **Tumores hipermutados** (un 16% de los casos): caracterizados por la presencia de fenotipo MSI, debido a un defecto de los mecanismos de reparación miss match repair (MMR), generalmente somático y derivado de la hipermetilación del promotor del gen que codifica para la proteína MLH1, dando lugar a un silenciamiento de la expresión del gen. Dentro de las características que presentan estos tumores se encuentran: alta tasa de mutaciones (fenotipo hipermutado), fenotipo metilador (CIMP), localización predominante del tumor en el colon derecho, y una alta incidencia de MSI.

2) **Tumores ultra mutados** (un 3% de los casos): caracterizados por con la presencia de mutaciones en el dominio exonucleasa de la ADN polimerasa épsilon y delta (*POLE*, *POLD1*), conllevando un malfuncionamiento enzimático, que induce la inserción de nucleótidos erróneos durante la replicación del ADN, dando lugar a la acumulación de gran número de errores (mutaciones).

3) **Tumores con inestabilidad cromosómica** (un 84% de los casos): caracterizados por una alta frecuencia de alteraciones somáticas en el número de copias somáticas del ADN, consecuencia de una combinación de la activación de oncogenes (*KRAS*, *BRAF*, *HER-2*, *PI3K*), e inactivación de genes supresores tumorales (*APC*, *SMAD*, *p53*...), ya sea por mutación o pérdida alélica, lo cual

provoca cambios en el proceso de evolución de adenoma a carcinoma, y completando el proceso de carcinogénesis. Y a diferencia de los tumores hipermutados, presenta una tasa baja de mutaciones.

2.2.2 SUBTIPOS MOLECULARES BASADOS EN CMS

La segunda clasificación fue propuesta por el Consorcio del Consenso de los Subtipos moleculares¹³³. Este consenso está basado en la conjunción de 6 clasificaciones con diferentes características histopatológicas, morfológicas y moleculares no supervisadas, la cual tiene un valor pronóstico. Esta clasificación está basada en datos transcriptómicos de 18 bases de datos obtenidas de bibliotecas públicas, incluida los datos del TCGA. Cada clasificación transcriptómica utiliza diferentes tipos de plataformas de análisis de expresión, de preservación de muestras y de diseños experimentales del estudio. Su análisis integrado, ha demostrado una asociación entre las diferentes clasificaciones, identificándose cuatro subtipos moleculares robustos, con valor pronóstico. Estos subtipos abordan diferentes características, que incluyen: factores genómicos, como el patrón de metilación, número de copias somáticas de variantes en el ADN (CNV), perfil mutacional, específicamente de KRAS y BRAF, perfil proteómico de vías de señalización oncogénica, y otras características fenotípicas, como la invasión estromal, y el infiltrado inmunitario.

Así podemos distinguir los cuatro subtipos (Fig. 5):

- 1) **CMS1 (Subtipo Inmune)**: Sucede en un 15-20% de los tumores colorectales, que presentan mutaciones en los genes de reparación del sistema MMR, miss match repair, *MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*, dando lugar al fenotipo MSI. Estas mutaciones pueden venir derivadas de síndromes hereditarios o de forma esporádica, principalmente por la vía de hipermetilación del promotor del gen que codifica para *MLH1*. La mayoría de los casos son esporádicos, y se pueden distinguir del Síndrome de Lynch, por la presencia de mutaciones en el gen *BRAF*. Presentan peor supervivencia que el síndrome de Lynch, pero mejor que la población MSS (estable), con una supervivencia relativa a los 5 años de 73% frente al 63% en población MSS.

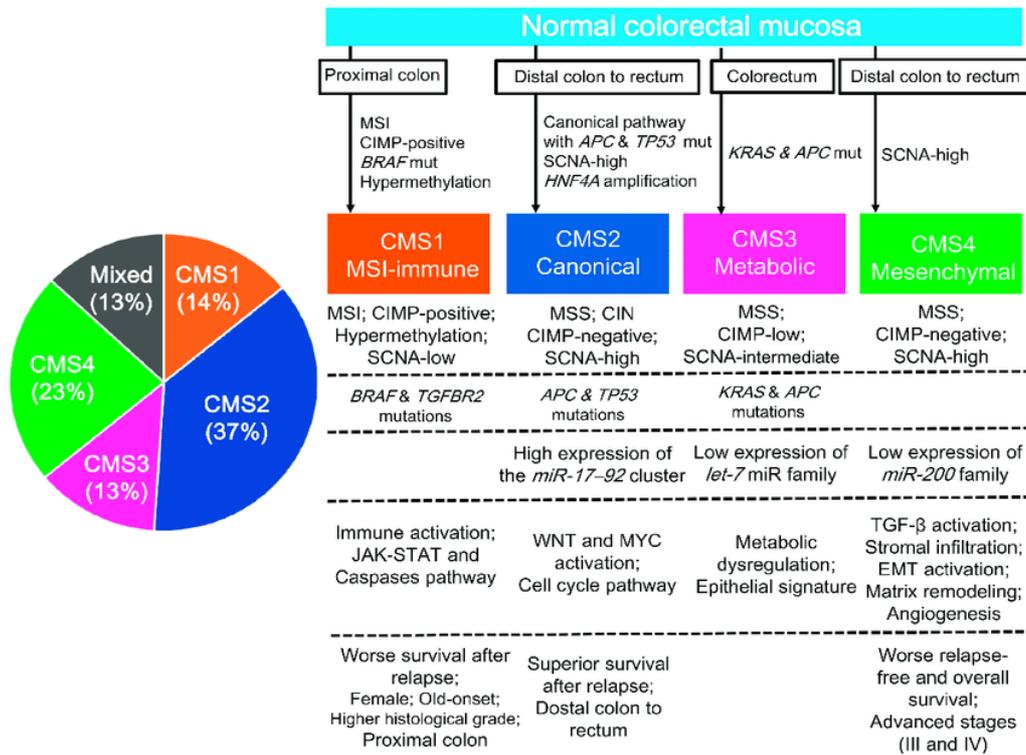


Figura 5: Esquema representativo de las características de los diferentes grupos descritos en el Consorcio del Consenso de los Subtipos moleculares (CMS). [adaptado de *Cancers* 2018, 10(1):26; license CC BY 4.0]

La presencia del fenotipo MSI, mitiga el efecto oncogénico de la mutación en *BRAF*, resultando tener mejor pronóstico los casos inestables (MSI) que estables, ambos con mutación en *BRAF*, y con tasas de supervivencia a los 5 años del 65% versus 46%¹³⁴.

Otro hecho diferencial de este subtipo es la presencia del fenotipo CIMP, siendo también un factor de buen pronóstico¹³⁵.

Fenotípicamente, hay evidencia que la asociación de buen pronóstico, y el fenotipo MSI, es debida a una alta infiltración inflamatoria local. En población MSI, a diferencia de los MSS, se observa una alta infiltración intratumoral de linfocitos T citotóxicos, aportando mejor supervivencia¹³⁶.

2) **CMS2 (Subtipo Canónico):** Se caracterizan por alteraciones en el número de copias somáticas (SCNA), desregulación de la vía *WNT* y de la *MAPK*. En el CCR, las principales ganancias se encuentran en regiones del cromosoma 20q,13q,8q y 7, siendo las pérdidas más frecuentes en 4p,8p,18q y 17p. La desregulación de la vía *WNT*, se traduce en la sobreexpresión de *Beta-Catenina*, conllevando un mal pronóstico a los pacientes¹³⁷. Fenotípicamente este subtipo, mediado por

Beta-Catenina, se caracteriza por presentar un alto índice proliferativo, conocido factor de mal pronóstico en CCR¹³⁸.

- 3) **CMS3 (Subtipo Metabólico)**: Este subtipo se caracteriza por la presencia de mutaciones en *RAS*. Mutaciones en *KRAS*, en enfermedad avanzada, están asociadas a mal pronóstico, y con el riesgo de desarrollar diseminación pulmonar. Tanto las mutaciones en *KRAS*, como en *NRAS*, son biomarcadores predictivos negativos de respuesta a anti-EGFR. Aunque la mayoría de los tumores CMS3, presentan mutaciones en *KRAS* (75%), no son exclusivos de este subtipo¹³⁹. Fenotípicamente *KRAS* ha sido asociada con el metabolismo en cáncer, estando más que probado la reprogramación metabólica del estado glicolítico en la supervivencia, y en el mantenimiento de la proliferación en un microambiente hostil. En un estudio, una firma genética de metabolismo es capaz de predecir que el riesgo de recaída estaba asociado con supervivencia. Así los 3 años la tasa de supervivencia para pacientes con una firma genética de bajo riesgo metabólico era del 84%, comparada con el 46% de aquellos con alto riesgo metabólico¹⁴⁰.
- 4) **CMS4 (Subtipo Mesenquimal)**: Este subtipo, de forma similar que el CMS2, presenta alto número de alteraciones en las copias somáticas, siendo la vía principal afectada la de TGF-Beta, que tiene máxima actuación en las células estromales. Un incremento de la invasión del estroma tiende a un incremento de la producción de *TGF-Beta*, y ésta a su vez incrementa las metástasis. El incremento del estroma tumoral es un factor de mal pronóstico. En un estudio con 710 pacientes con CRC, la supervivencia a los 5 años descendía del 77%, en los que presentaban bajo estroma tumoral a un 59%, en los que presentaban altos niveles de estroma tumoral¹⁴¹⁻¹⁴².

2.3 HETEROGENEIDAD TUMORAL

Si nos atenemos etimológicamente a la palabra heterogeneidad tumoral, nos describe la observación de que diferentes células tumorales, pueden mostrar distintos perfiles morfológicos y fenotípicos, que incluyen morfología celular, expresión génica, metabolismo, motilidad, proliferación y potencial metastásico^{143,144}. A pesar de los avances en el tratamiento del CCR, las tasas de supervivencia permanecen enormemente variables entre diferentes pacientes, incluso con el

mismo estadio patológico. Durante la última década, se ha clarificado que estas diferencias en el pronóstico pueden ser explicadas parcialmente por diferencias en la biología del tumor, por lo que el CCR debería ser considerado como una enfermedad altamente heterogénea y dinámica, caracterizada por múltiples cambios moleculares durante su proceso evolutivo¹⁴⁵.

La heterogeneidad tumoral aborda el concepto, de que un único tumor, está compuesto por múltiples clonas diferentes de células tumorales, por tanto, es un punto de gran interés en la genómica de los tumores. Se ha hipotetizado que juega un papel crítico en la progresión tumoral, siendo el mayor obstáculo para la búsqueda de tratamientos de precisión. Durante el proceso de carcinogénesis y progresión tumoral, múltiples subclonas celulares surgen por vía de diferentes alteraciones moleculares, que afectan al pronóstico en diversos tumores como la leucemia linfática crónica, cáncer de cabeza y cuello, o el adenocarcinoma de pulmón¹⁴⁶.

2.3.1 TIPOS DE HETEROGENEIDAD TUMORAL

La heterogeneidad tumoral puede ser dividida en dos: intertumoral e intratumoral. La **heterogeneidad intertumoral** comprende diferencias moleculares en tumores del mismo tipo histológico, y del mismo órgano entre diferentes pacientes. Un ejemplo serían los descritos anteriormente en la subclasificación del TCGA, y los subtipos moleculares del CCR (Fig 6).

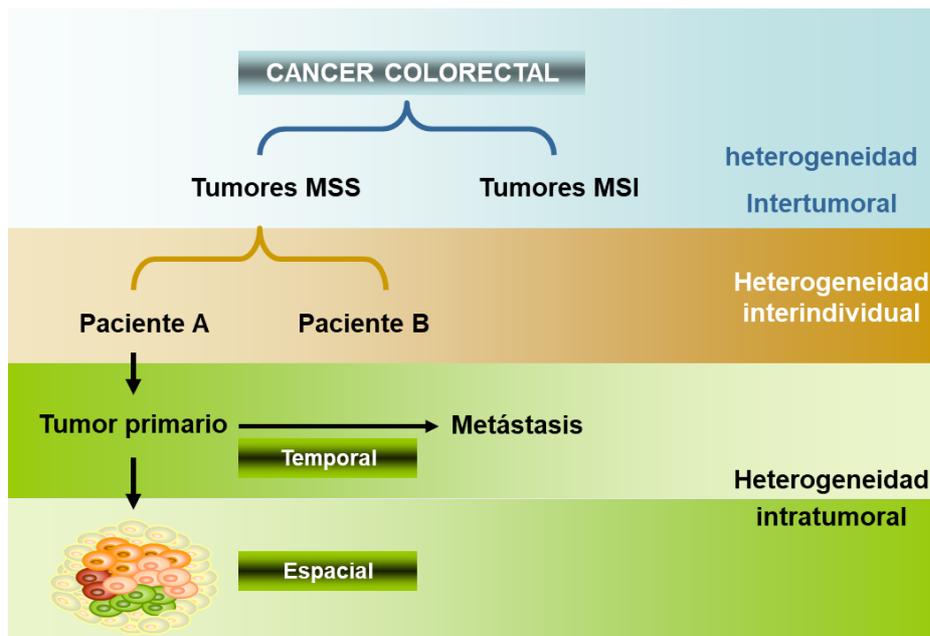


Figura 6. Esquema representativo de los tipos de heterogeneidad tumoral a partir de un tipo tumoral de origen.

La **heterogeneidad intratumoral** hace referencia a las diferencias dentro de la misma masa tumoral (espacial) o en diferentes lesiones tumorales del mismo individuo (temporal) (Fig 6). La heterogeneidad espacial describe variaciones moleculares en distintas regiones de un mismo tumor. La heterogeneidad intratumoral temporal se refiere a la naturaleza dinámica del CCR, con alteraciones moleculares, que se desarrollan dentro de un tumor a lo largo del tiempo, ya sea entre el tumor primario y sus metástasis, entre diferentes lesiones de un mismo origen tumoral, o a lo largo de un tratamiento (heterogeneidad intratumoral longitudinal)¹⁴⁷.

2.3.2 MODELOS DE HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL

Varios modelos han propuesto describir el origen y el papel de la heterogeneidad tumoral. Existen controversias sobre si la heterogeneidad tumoral es una condición necesaria para la supervivencia tumoral, o meramente es un producto de la tumorigénesis y de la progresión tumoral; ante lo cual diferentes procesos de desarrollo tumoral ofrecen diferentes respuestas.

El modelo de las "*cancer stem cell*"; se basa en la que sólo una minoría de células tumorales son capaces de la iniciación y la progresión tumoral. Estas células representan la unidad básica de crecimiento y diseminación tumoral. Estas células iniciadoras, han sido descritas a través proteínas específicas de membrana (CD133, CD166 o CD144), que ocupan sólo un 11% de las células epiteliales en un tumor primario de CCR. En modelos murinos inmunodeficientes, se ha observado que la inyección subcutánea de CD133 positivas, tienden a la formación de tumores con morfología similar al tumor originario, y por el contrario, la inyección de células CD133 negativas, no dan lugar a la formación de tumores. También se ha demostrado, que estas "stem cells", están incrementadas en tumores tras la progresión a tratamiento quimioterápico, y eso podía explicar las recaídas tras realizar tratamiento¹⁴⁸.

Otra teoría de la génesis de la heterogeneidad tumoral viene de la aproximación Darwiniana, que propone que el desarrollo del cáncer proviene de ramificaciones, con una evolución clonal. En este modelo, la acumulación de mutaciones o alteraciones no genéticas tiende a formar subclonas tumorales con una capacidad variable de adaptación al microambiente tumoral, y por tanto, tendiendo a la

heterogeneidad dentro y entre tumores¹⁴⁹. Ello implicaría que la ramificación evolutiva, podría ser rastreada mediante el análisis de la distribución y frecuencia de las mutaciones en un tumor. Las mutaciones ubicuas estarían presentes en todas las células tumorales, y representarían un evento temprano en el desarrollo tumoral. Contrariamente, las mutaciones más tardías ocurrirían durante el proceso de progresión tumoral, y sólo estarían presentes en determinadas subclonas tumorales. Este modelo ha sido demostrado en cáncer páncreas y renal¹⁵⁰⁻¹⁵¹.

Para investigar la heterogeneidad en diferentes estadios de progresión tumoral de CCR, se han analizado diferentes mutaciones, en distintas áreas del tumor primario, así como en sus correspondientes metástasis. De forma sorprendente, los puntos mutacionales decrecen con la progresión tumoral. Los tumores más avanzados más frecuentemente presentan una clona dominante, con otras múltiples subclonas. Esta clona dominante era menos frecuente en tumores en estadios tempranos. Este fenómeno se ha denominado “efecto en cuello de botella”, y se refiere a un decrecimiento temporal en la heterogeneidad tumoral debido a la selección de las subclonas más ventajosas en el momento de la diseminación. Un segundo efecto substancial para aumentar el cuello de botella es el tratamiento antitumoral, dado que se seleccionan aquellas subclonas con mayor capacidad de sobrellevar el tratamiento, dando lugar al fenómeno de heterogeneidad longitudinal. Debido a estos eventos, las mutaciones ramificadas, podrían convertirse en muy importantes para el tumor, con relación a la adaptación a unas nuevas condiciones¹⁵².

En el contexto del tratamiento, los tumores que presentan muchas ramificaciones son más propensos a tener subclonas resistentes a éste, como consecuencia de un incremento de la diversidad genética. Con esta valoración, se podría postular que el grado de heterogeneidad por si mismo, es un potencial biomarcador, encontrando una asociación entre su presencia y el pronóstico de la enfermedad neoplásica, así como de la eficacia terapéutica.

Otro modelo diferente de la naturaleza de la heterogeneidad tumoral, enfatiza el aspecto temporal de las mutaciones tumorales. Este modelo denominado “Big bang model” se basa en que las mutaciones responsables del desarrollo, y progresión tumoral, aparecen de forma temprana en el CCR¹⁵³. El comportamiento biológico tumoral está determinado de forma temprana, y eso explicaría, porque tumores de gran volumen no metastatizan, y tumores de pequeño tamaño provocan

diseminación de forma temprana. Este fenómeno se pudo observar mediante un análisis en diferentes áreas de tumorales, donde se analizó la distribución regional de las alteraciones genéticas en CCR. Se observaron subclonas individuales, que sólo podían ser identificadas en adenomas, y subclonas fusionadas, que fueron sólo características de carcinomas invasivos. Esta selección espacial y temporal soportaría el concepto de expansión clonal de los tumores.

2.3.3 HETEROGEIDAD TUMORAL EN EL CCR

Globalmente el CCR es portador de una media de 80 mutaciones, pero menos de 15 son las responsables de conducir el proceso de tumorigénesis, y progresión tumoral¹⁵⁴.

Una reciente publicación comparaba las aberraciones en número de copias en 62 tumores primarios, con sus respectivas metástasis, encontrándose una concordancia del 88% de alteraciones entre ellos¹⁵⁵. Diferencias mayores se han encontrado en tumores primarios de diferentes pacientes, apoyando que la heterogeneidad intertumoral es mayor que la existente entre el tumor primario y metástasis de un mismo paciente.

Muchos autores abogan que lo que determina el pronóstico de la enfermedad, es el global de mutaciones, y vías de señalización aberrante, que la presencia de una mutación específica.

Vermaat et al, analizaron en tumores primarios de CCR, y sus respectivas metástasis, las alteraciones genéticas conocidas que están envueltas en los procesos de señalización de este¹⁵⁶. Los autores encontraron diferencias moleculares significativas, con un alto número de pérdidas y ganancias a lo largo del genoma entre ambas lesiones. Pero cuando sólo se centraron en analizar el codón 12 y 13 para detectar mutaciones en *KRAS*, existía unas concordancias de más del 95%.

En otro estudio, Sveen et al, analizaron en 135 metástasis hepáticas de 45 pacientes con CCR¹⁵⁷, la heterogeneidad intermetastásica, complejidad genética, y su influencia en la supervivencia. Concluyeron que la heterogeneidad intermetastásica, ni depende de la complejidad genética ni está relacionada con el número de metástasis, y que la heterogeneidad no sólo es un factor de pobre

supervivencia, sino un predictor de supervivencia más fuerte que los parámetros clínico-histo-patológicos clásicos conocidos en pacientes con CCR metastásico. En la mayoría de los estudios publicados, como el de Vermaat et al, se ha descrito una alta concordancia de las mutaciones en *KRAS* entre el tumor primario y sus respectivas metástasis (88-96%). En cambio, la concordancia en *KRAS* entre tumor primario, y sus respectivos ganglios linfáticos, es mucho menor (35-40%), siendo un tema controvertido su uso como marcador de heterogeneidad tumoral¹⁵⁸.

En el contexto de las mutaciones en *KRAS* como factores predictivos de eficacia a agentes anti-EGFR en CCR, se ha descrito que algunas subclonas tumorales resistentes, podrían estar presentes en una pequeña fracción del bloque tumoral, y que no serían detectables por las técnicas convencionales de PCR¹⁵⁹. Se ha demostrado que estas subclonas podrían ser responsables de la resistencia primaria, o del desarrollo de resistencias secundarias a estos agentes. Ejemplo de ello, es el trabajo de Laurent-Puig et al¹⁶⁰, dónde demostraron la existencia de 22 mutaciones adicionales en *KRAS* en 136 tumores, que no respondieron a tratamiento con anti-EGFR, utilizando técnicas de alta sensibilidad (Digital doplelet PCR); y que no se detectaron por técnicas convencionales de qPCR. Las subclonas que aparecen con las resistencias secundarias al tratamiento, presentan un comportamiento más heterogéneo, y podría ser la manifestación de un crecimiento competitivo por una simple selección Darwiniana. ya pueden ser detectadas en el tumor primario, y analizándolas por técnicas de alta sensibilidad, pueden permitir decisiones de medicina personalizada. Las subclonas que aparecen con las resistencias secundarias al tratamiento, presentan un comportamiento más heterogéneo, con mutaciones en *KRAS* y en otros genes diferentes, todos ellos implicados en la vía de señalización de la MAPK. Este comportamiento mutacional, difícilmente es visto en tumores primarios, y podía ser la manifestación de un crecimiento competitivo en subclonas resistentes a tratamiento, por una simple selección Darwiniana¹⁶¹⁻¹⁶².

El microambiente tumoral y su rol, en el proceso de carcinogénesis y progresión tumoral ha sido considerado de enorme interés. Es claro, que el microambiente influye en la expresión génica en las células tumorales, y por tanto un factor significativo que contribuye a la heterogeneidad tumoral¹⁶³.

2.4 EPIGENÉTICA

2.4.1 DEFINICIÓN

La epigenética, se define como las alteraciones heredables de la expresión de genes, sin cambios permanentes en la secuencia del ADN, y sin cambios en la estructura genómica. Los principales mecanismos epigenéticos en cáncer comprenden: la metilación del ADN, la modificación de histonas, así como la regulación mediante los ARN no codificantes (ncARN). Estos modificadores epigenéticos se han postulado como biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos de respuesta para el tratamiento del CCR¹⁶⁴ (Fig 7) Esta tesis se ha centrado en las alteraciones relacionadas con la metilación del ADN, como mecanismo epigenético predominante.

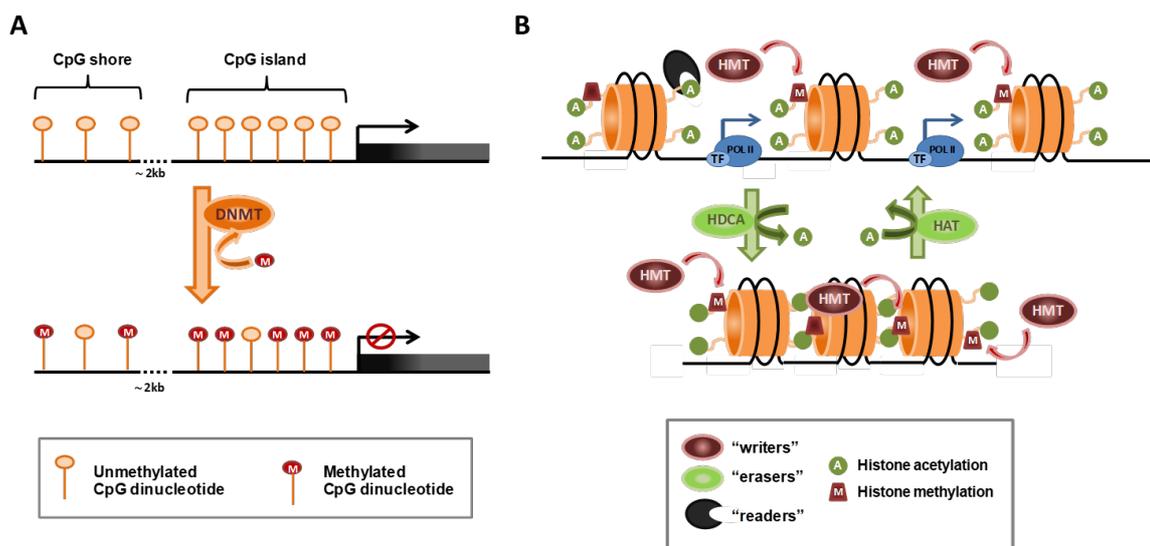


Figura 7: Mecanismos epigenéticos de regulación génica. A) Metilación de citosinas del ADN en zonas promotoras para el silenciamiento génico. B) Modificaciones de histonas en la cromatina. [adaptado de "Pinyol et al. Handbook of Translational Medicine 2016"]

2.4.2 MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN CÁNCER

2.4.2.1 MECANISMOS DE METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN es uno de los procesos epigenéticos más frecuentes que regulan la expresión génica. El proceso de metilación del ADN implica la adición de un grupo metilo (CH₃) en la posición C5 del anillo de la citosina, y regulado por las ADN metiltransferasas (DNMT), produciendo un nuevo nucleótido, la 5-metilcitosina (Fig.7a). En humanos, esta modificación ocurre mayoritariamente en los

dinucleótidos CpG, que son regiones de ADN donde se siguen inmediatamente los residuos de citosina por residuos de guanina en la dirección 5' a 3', unidos por un enlace C-fosfodiéster-G. En el genoma de los mamíferos, la mayoría de estos sitios CpG están metilados, incluidos los que se encuentran en regiones no codificantes, a lo largo del genoma, que se relacionan con estabilidad genómica. Por el contrario, las islas CpG son secuencias ricas en CpG, que generalmente no están metiladas en mamíferos, y que por lo general contienen 200 a 2000 nucleótidos, de los cuales > 50% son CpG; aproximadamente 60–70% de los promotores de genes contienen islas CpG, y se relacionan con la regulación de la expresión génica¹⁶⁵.

En cáncer, alteraciones de los patrones normales de metilación del ADN, incluyen la hipometilación del ADN, que ocurre patológicamente en regiones normalmente metiladas del genoma, y la hipermetilación del ADN, que suele ocurrir en las islas CpG de promotores de genes, asociado con la supresión transcripcional de genes supresores de tumores en células tumorales. Estas alteraciones están presentes en el caso del CCR, en el que la hipermetilación aberrante, se ha identificado en las regiones promotoras de importantes genes supresores, como *CDKN2A* (en los promotores de cada una de sus dos proteínas reguladoras *p16INK4A* y *p14ARF*), *MLH1* y *APC*¹⁶⁶.

La hipometilación general del genoma, fue uno de los primeros eventos de metilación aberrante informados en CRC, y constituye un evento temprano en la carcinogénesis colorrectal. Se ha observado hipometilación en diferentes estadios, desde adenomas tempranos, hasta adenocarcinomas y metástasis, con una correlación lineal entre el grado de la desmetilación, y el estadio de la enfermedad¹⁶⁷.

En el CCR, la hipometilación del ADN se ha relacionado también con la activación de proto-oncogenes, ya sea por pérdidas de impronta genética (por ejemplo, *IGF2*), o por activación directa (como, *MYC* y *HRAS*)¹⁶⁸.

2.4.2.2 MODIFICACIONES DE HISTONAS

En las células eucariotas, el ADN está envuelto alrededor de las histonas, que están compuestas por octámeros de proteínas, que comprenden un par de cada una de las cuatro proteínas histonas centrales, histona 2A (H2A), H2B, H3 y H4, y que, de forma estructural, forman unas unidades llamadas nucleosomas, que están empaquetadas con otras proteínas nucleares para formar cromatina. Cada núcleo

de histona posee una cola característica que está enriquecida en residuos de lisina y arginina, que están sujetos a procesos post-transcripcionales. La modificación de histonas ha sido descrita tanto en procesos fisiológicos de crecimiento, como en procesos patogénicos como el cáncer (Fig. 7b). El proceso de acetilación neutraliza la carga positiva de la cola de las histonas, debilitando la interacción electrostática las histonas y el ADN, y por tanto influyendo en el estado de compactación de la cromatina¹⁶⁹. En cáncer la hiperacetilación de histonas, se ha relacionado con la expresión de proto-oncogenes, mientras que la hipoacetilación se asocia con el silenciamiento de genes supresores. Otro concepto es la metilación de las histonas, que, a diferencia de la acetilación, no sólo cambia la compactación del ADN, sino que crea puntos de enganche en la cromatina, que pueden ser reconocidos por proteínas, como las encargadas de los complejos transcripcionales. La adición del grupo metilo a los residuos de la lisina o arginina de la cola de las histonas, tiende a la activación o a la represión de la expresión de los genes, que pueden promover la progresión de los tumores¹⁷⁰.

2.4.2.3 REGULACIÓN MEDIANTE ARN NO CODIFICANTES

Son unos mediadores transcripcionales que participan en la regulación de la expresión de los genes, tanto en procesos fisiológicos como en patogénicos. Tras su transcripción, no son elementos codificantes de proteínas, y pueden tener efectos pro-tumorales o antitumorales. Los micro ARN (miARNs), son simples cadenas de 18 a 25 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión de más del 60% de genes de proteínas codificantes, incluyendo aquellas que regulan los procesos de proliferación, diferenciación, y apoptosis celular. Por otro lado, los ARN largos no codificantes (lncARNs), funcionan como reguladores de la transcripción a través de múltiples actividades como: interacción génica, modificación de la cromatina y regulación de la arquitectura nuclear, a los que se ha de añadir las mismas funciones que los miARNs, en referencia a la proliferación, diferenciación y apoptosis celular¹⁷¹.

2.4.3 LA METILACIÓN DEL ADN COMO BIOMARCADOR EN EL CCR

El biomarcador epigenético más usado en práctica clínica del CCR ha sido el estado de metilación del promotor del gen que codifica para MLH1, como mecanismo de silenciamiento del gen a nivel somático. Se analiza mediante la detección de la

proteína por inmunohistoquímica, para el análisis de inestabilidad de microsatélites, que se puede completar por el análisis del estado de metilación por técnicas de pirosecuenciación. Se usa como estrategia diagnóstica, para discriminar entre los pacientes con síndrome de Lynch, en los que la causa más frecuente de inactivación de *MLH1* es por mutaciones germinales en el gen, y en CCR esporádico por pérdida del MMR¹⁷².

Otro biomarcador epigenético diagnóstico de CCR, es el estado de metilación del gen *SEPT9* en plasma, que codifica para la proteína septina 9, envuelta en procesos celulares dinámicos, como de exocitosis. Fue el primer biomarcador molecular usado en sangre, para el screening del CCR, con una sensibilidad que oscila del 48% al 90%, y una especificidad desde 73 al 97%. Su mayor limitación es su pobre sensibilidad para la identificación de precursores benignos, como los adenomas, variando desde un 8% al 39%¹⁷³. Otro biomarcador epigenético diagnóstico descrito, es el estado de metilación del gen *VIM* (vimentina), que puede ser detectado tanto en sangre como en heces¹⁷⁴.

En cuanto a biomarcadores epigenéticos pronóstico de CCR, se han descrito algunos, pero ninguno de ellos es habitualmente usado en la práctica clínica diaria. Un ejemplo es la hipermetilación de *CDKN2A* (específicamente *p16INK4A* promotor), ya sea en tejido o en sangre, asociada con un mal pronóstico, así como con un incremento del riesgo de recurrencia, y de aparición de metástasis en pacientes con CCR. En dos estudios antiguos, *CDKN2A*, mostraron una pobre supervivencia, en pacientes con estadio II de colon, y en estadio II-III de cáncer de recto tratados con cirugía y tratamiento adyuvante basado en fluoropirimidinas¹⁷⁵.

Es relevante el interés de encontrar biomarcadores predictivos basados en el estado de metilación génica, para la selección de tratamiento en pacientes con CCR. Hay pocos estudios dirigidos a este fin, y no han prosperado para su uso en la práctica clínica. Un ejemplo es el análisis de la hipermetilación en el promotor del gen que codifica para *MGMT*, una proteína de reparación del ADN envuelta en la defensa de la mutagénesis y los agentes alquilantes. Esta ha sido asociada con buen pronóstico en paciente con CCR avanzado, después de tratamiento adyuvante con fluoropirimidinas, y con aumento de la respuesta a tratamiento preoperatorio con quimio-radioterapia, particularmente usando dacarbazina¹⁷⁶. Este biomarcador se ha establecido en la práctica clínica del glioblastoma, pero no en el caso del CCR¹⁷⁷. Otro ejemplo es el papel del silenciamiento epigenético del

gen MLH1, dando lugar al fenotipo MSI, en la predicción de respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas, en régimen adyuvante, así como para la administración de inmunoterapia¹⁷⁸.

2.4.4 USO DE PERFILES DE METILACION PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EN CCR

Uno de los principales problemas en el cáncer, es la presentación de mecanismos de resistencia primaria y secundaria, dónde los cambios epigenéticos pueden ser responsables de los mismos. Los perfiles de metilación pueden ser útiles como herramienta de búsqueda de biomarcadores predictivos en CCR. Un ejemplo es el trabajo de Moutinho et al¹⁷⁹, dónde se analizan diferencias epigenéticas, a través de un perfil de metilación en células de CCR, sensibles y resistentes al oxaliplatino. Se observó que la hipermetilación del gen SRBC estaba asociado con una, pero supervivencia en una cohorte de tumores colorectales avanzados tratados con oxaliplatino. Estos resultados dan base para realizar futuros estudios, para validar la hipermetilación del gen SRBC como marcador predictivo en CCR resistente al oxaliplatino. Los perfiles de metilación pueden mostrar su utilidad en la identificación de tumores primarios de origen no filiado, para desarrollar un tratamiento más específico, y por tanto mejorar su supervivencia. Esto se aborda en el trabajo de Moran et al, dónde basándose en una firma de metilación de más de 2700 muestra de tumores conocidos (EPICUP), se predice a partir de una serie de 216 tumores de origen no filiado, su origen, en un 87% de los casos, y se objetiva un aumento de supervivencia en los pacientes que recibieron un tratamiento específico según la firma EPICUP, en comparación con los que recibieron tratamiento empírico¹⁸⁰.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS: RACIONAL DE EPIGENÉTICA, HETEROGENEIDAD Y CCR

El CCR avanzado, supone un grave problema sanitario, tanto por su incidencia como por su mortalidad. Si bien, en los últimos 10 años se ha mejorado la tasa global de supervivencia, en estadios avanzados el pronóstico sigue siendo pobre, a pesar de las nuevas incorporaciones terapéuticas.

Ya se ha comentado en apartados previos, la visión del CCR como una enfermedad heterogénea. Diferentes subtipos moleculares, con diferentes alteraciones genéticas, diferentes fenotipos, a los que, en práctica clínica, salvo unos casos específicos, tratamos de forma similar. Si ponemos atención al proceso de carcinogénesis, hay varias teorías evolutivas, dónde ya sea de entrada, o durante el desarrollo del tumor, van a aparecer alteraciones genéticas, que van a dirigir todo el proceso de crecimiento tumoral, y que van a conformar un tumor completamente diferente al que nos encontramos previo a iniciar cualquier tipo de tratamiento.

La epigenética se presenta como una herramienta útil, para la detección de cambios de expresión génica, y más concretamente con la metilación, para encontrar diferencias entre tumores, que no sean debidas a cambios simples secundarios del análisis de mutaciones.

Con todo lo anteriormente expuesto, la hipótesis de trabajo se basa en utilizar la epigenética como posible herramienta diferenciadora de heterogeneidad tumoral en el CCR avanzado. La epigenética del tumor nos aportará información de la expresión génica diferencial dentro del mismo tumor, y en diferentes situaciones de la enfermedad.

El análisis epigenético de la heterogeneidad intratumoral espacial, nos permitirá determinar cuál es la región intratumoral más heterogénea. En un segundo paso, también nos permitirá determinar la heterogeneidad intratumoral temporal, identificando a qué zona intratumoral del tumor primario se parece más epigenéticamente la metástasis pareada. Estos análisis se correlacionarán con todos los parámetros clínicos y patológicos recogidos previamente, tanto de los pacientes, como de las muestras tumorales.

El conocimiento de estos cambios nos ayudará a entender mejor la naturaleza del tumor, y podría dar cabida al diseño de nuevos fármacos epigenéticos, que hagan sinergia con drogas ya establecidas, con el fin de establecer una mejora pronóstica en la evolución de los pacientes con CCR.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

3.1 Análisis y caracterización epigenética de la heterogeneidad intratumoral espacial: Determinación de las diferencias epigenéticas entre diferentes regiones tumorales, para elucidar su impacto en la naturaleza, y en el pronóstico del tumor. Para ser llevado a cabo, el objetivo principal se divide en tres subobjetivos.

3.1.1 Recolección de forma retrospectiva de una cohorte de CCR, procesamiento de muestras de tumor primario incluidas en parafina, así como sus respectivas metástasis.

Análisis descriptivo de las características clínicas, histopatológicas y moleculares.

3.1.2 Análisis epigenético de metilación del ADN de tres regiones intratumorales (frente invasivo tumoral, zona cercana al tracto digestivo y zona central) del tumor primario, así como de las metástasis hepáticas pareadas.

3.1.3 Análisis de datos y evaluación de asociación con el pronóstico, así como de otros parámetros clínico-patológicos.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

3.2 Análisis y caracterización epigenética de la heterogeneidad intertumoral: Determinar si las diferencias epigenéticas entre diferentes tumores son superiores a las existentes entre las diferentes regiones intratumorales.

3.3 Análisis de la heterogeneidad intratumoral temporal: Determinar qué región del tumor primario es más epigenéticamente similar a su metástasis asociada. Correlación de estos datos, con parámetros clínicos y patológicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio experimental, retrospectivo, no controlado, en el que el objetivo principal es determinar la variabilidad epigenética en muestras parafinadas tanto de tumor primario, como de sus metástasis en los casos disponibles, en pacientes con CCR.

4.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO

La población a estudio comprende muestras de pacientes que han sido operados tanto de su tumor primario, y en algunos casos de sus metástasis de origen hepático, que no han sido tratadas previamente.

A través del repositorio de muestras del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Germans Trias i Pujol y del Hospital del Valle d'Hebrón, se revisaron muestras de 151 pacientes, desde 1990 hasta 2011, con las características previamente citadas. Las muestras tumorales obtenidas, estaban incluidas en parafina (FFPE), y procedían del proceso quirúrgico.

De este grupo de pacientes se generó una base de datos, excluyéndose los pacientes que no cumplían los criterios de inclusión que se enumeran a continuación.

Finalmente, la tesis comprende la recopilación de forma retrospectiva de 79 pacientes con CCR, donde las muestras de parafina obtenidas a través de la intervención quirúrgica fueron analizadas. De los 79 tumores primarios, disponíamos de tejido de metástasis hepáticas pareadas en 23 pacientes (10 sincrónicas y 13 metacrónicas).

CRITERIOS INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Los pacientes debían cumplir los siguientes criterios de inclusión, y ninguno de exclusión.

Criterios de Inclusión:

- Consentimiento informado firmado
- Edad igual o superior a 18 años
- Pacientes de CCR confirmado histológicamente

- Disponibilidad de tejido tumoral primario, y cuando fuera posible, tejido metastásico incluido en parafina.

Criterios de Exclusión:

- Pérdida de seguimiento
- No disponibilidad de datos sociodemográficos
- Muestras de tejido parafinado tratadas previamente
- No cumplir alguno de los criterios de inclusión

4.3 RECOGIDA DATOS

Los datos de los pacientes fueron recogidos retrospectivamente, tras firma del consentimiento informado, y tras valoración de cumplimiento de criterios de inclusión. Se integraron en una base de datos, usándose el programa estadístico SPSS 12.0, para la correlación de los datos obtenidos a nivel clínico y experimental

4.3.1 Tipos de variables incluidos:

- Edad y sexo
- Estadio de la enfermedad
- Localización del tumor primario y de las metástasis
- Medición de las lesiones diana antes del tratamiento (RECIST)
- Recaída: Fecha y localización de la misma
- Tratamiento adyuvante y esquema administrado, si lo recibió
- Respuesta global, tiempo a la progresión, supervivencia
- Alteraciones moleculares (fenotipo MSI, mutaciones en KRAS o BRAF)
- Características histopatológicas

4.4 ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE MUESTRAS

4.4.1 Delimitación de regiones intratumorales

Los 79 tumores primarios obtenidos de muestras en parafina se sometieron a macrodissección (Fig.8). Se evaluaron tres regiones tumorales diferentes en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Germans Triás i Pujol (Badalona), utilizando la tinción Hematoxilina Eosina, y el microscopio óptico. Todas las

muestras del tumor contenían al menos el 80% de las células de carcinoma para cada sección intratumoral. Las células estromales e inflamatorias, también se contaron para cada región. Se definieron tres regiones: la región más cercana a la superficie del tracto digestivo (TS), la masa tumoral central (CB) y el frente invasivo (IF).

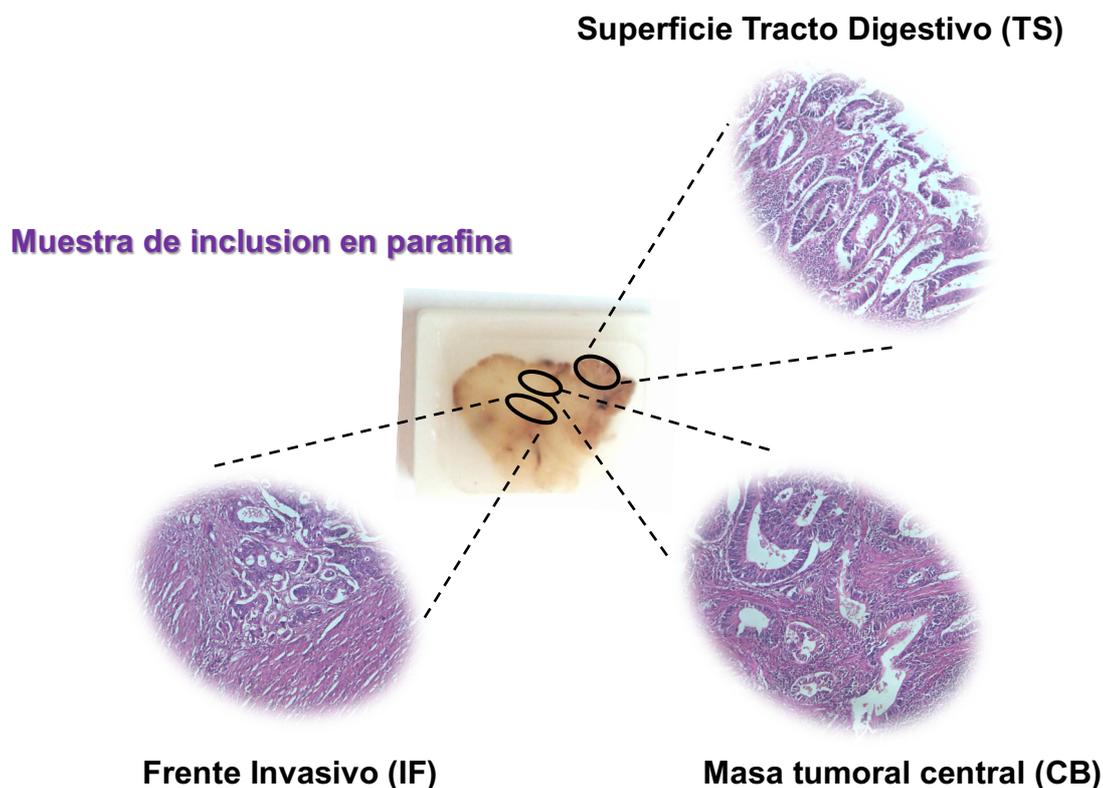


Figura 8. Macrodissección de las tres zonas intratumorales para el análisis epigenético: frente invasivo (IF), tumoración central (CB) y zona cercana a la superficie del tracto digestivo (TS).

4.4.2 Extracción del ADN. Control de calidad

Después de la desparafinización por xileno, y la digestión de tejidos por proteinasa K (Qiagen, Venlo, Países Bajos), el ADN fue extraído con el kit de extracción de ADN E.Z.N.A FFPE (Omega Bio-Tek Inc, Norcross, GA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó por un método fluorimétrico (Ensayo Quant-iT PicoGreen dsDNA; Life Technologies, Carlsbad, CA), y se verificó su idoneidad para ser sometido al pretratamiento con el kit de restauración de FFPE, mediante el ensayo Infinium HD FFPE QC (Illumina Inc., San Diego, CA). Este método consiste en la realización de una reacción en cadena de polimerasa

cuantitativa (qPCR) a partir de 2 ng de ADN. El valor para determinar la calidad del ADN (DCq), fue calculado restando el valor Cq medio de la muestra interrogada al valor Cq de un estándar proporcionado por el fabricante. Todas las muestras dieron como resultado DCq <5, que es el umbral de recomendación para determinar la idoneidad de las muestras procedentes de FFPE, para su posterior restauración del ADN.

4.4.3 Conversión con bisulfito del ADN

Las muestras con suficiente calidad, fueron sometidas al método de conversión por bisulfito (Fig. 9). Brevemente, este método se basa en usar bisulfito para convertir en el ADN las citosinas (C) no metiladas en uracilo (U), que posteriormente se convertirá en timina (T), y eliminar el grupo metilo de las C metiladas, conservándose como C. Esta conversión es necesaria para llevar a cabo los pasos posteriores, ya que los grupos metilos serían eliminados en los procesos de amplificación, y no se podría discriminar entre C metilada y no metilada. Mediante este método, la C metilada se conserva como C y la no metilada se convierte en T. La conversión de bisulfito se llevó a cabo utilizando 300 ng de ADN, aleatorizado en una placa de 96 pocillos, y usando el kit de metilación de ADN EZ-96 kit (Zymo Research Corp, Irvine, CA) siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

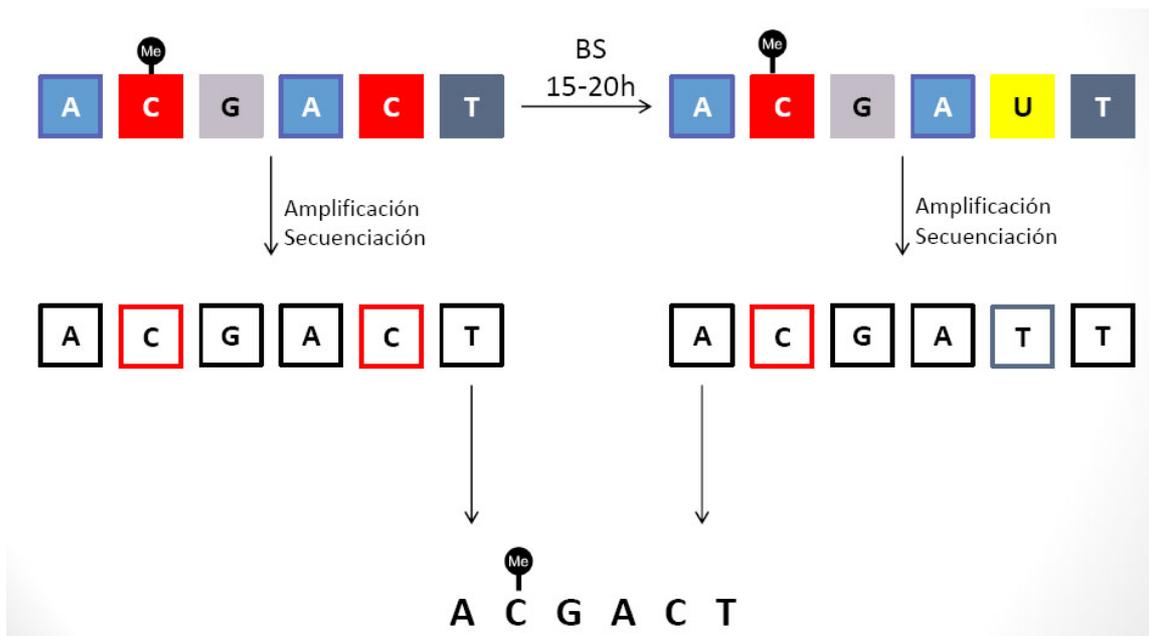


Figura 9. Imagen de la conversión por bisulfito (scykness.wordpress.com)

4.4.4 Análisis de metilación de ADN mediante tecnología microarray

Este análisis fue externalizado y se llevó a cabo en la Unidad de Epigenómica del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC), en el Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), bajo la supervisión del equipo del Dr. Manel Esteller. El ADN ya convertido, fue sometido a un proceso de restauración, mediante el kit *Infinium FFPE Restoration kit* (Illumina). Este paso es necesario para regenerar las cadenas de ADN altamente degradadas al haber sido extraídas de tejido conservado en FFPE. Posteriormente, este ADN procesado fue usado para el análisis de microarrays de metilación de ADN mediante la tecnología de Illumina *Infinium Human-Methylation450 BeadChip array*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 10). Esta tecnología permite interrogar más de 450.000 posiciones CpG a lo largo de todo el genoma, cubriendo un 99% de los genes registrados en RefSeq. Se basa en un sistema de oligonucleótidos que permiten discriminar entre CpG metiladas o no metiladas mediante la lectura fluorimétrica en un escáner, de forma cuantitativa, valorando 0 como no metilado y 1 como totalmente metilado. La posterior normalización de los datos de intensidad sin procesar (crudos), se llevó a cabo utilizando el software de Illumina GenomeStudio. Las intensidades normalizadas se transformaron en valores beta, calculando por marcador, el cociente entre intensidad metilada dividida, por la suma de intensidades metiladas, y no metiladas, y una compensación de 100.

4.4.5 Análisis de datos de metilación del ADN

El análisis de datos se realizó mediante el entorno estadístico R, en la Unidad de Bioinformática del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC), en el Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), bajo la supervisión del equipo del Dr. Manel Esteller. Brevemente, partiendo de los datos normalizados, se realizó un filtraje para eliminar los datos procedentes de CpGs relacionadas con los cromosomas X e Y, así como aquellas sondas cercanas a sitios que contenía un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), según la anotación del archivo de descripción del producto (Human-Methylation450, versión 1.2). Para afirmar que las 3 diferentes zonas intratumorales asignadas para cada paciente tenían realmente el mismo origen, se utilizaron las sondas diseñadas dentro del microarray para

apuntar a 65 SNP, considerando que procedían del mismo paciente si no presentaban diferencias significativas (p -valor superior a 0.05) en estas posiciones.

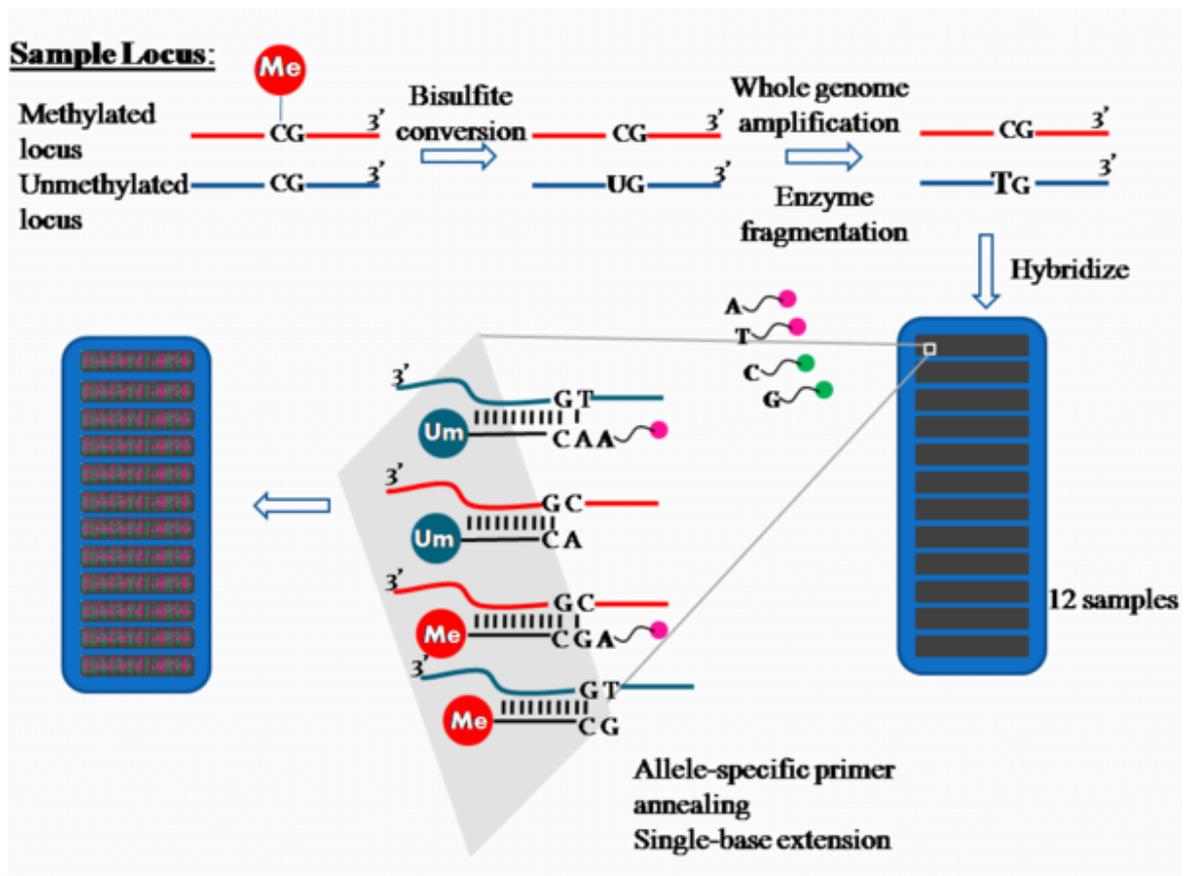


Figura 10. Esquema de la hibridación de microarrays de metilación de ADN mediante la tecnología Infinium Human-Methylation450 Beadchip array de Illumina. (www.Illumina.com).

La representación del heatmap no supervisado de las 3 diferentes regiones tumorales (TS, CB e IF) para toda la cohorte de pacientes, se generó utilizando el 1% de los sitios CpG seleccionados al azar, y organizándolos, aplicando un método de agrupación jerárquica (hierarchical clustering) basado en distancias de Manhattan agregadas por el vínculo de Ward.

De manera similar, se usó el método de agrupación jerárquica basado en distancias Manhattan para determinar de forma no supervisada, la zona intratumoral más diferencial por paciente, así como la región intratumoral más epigenéticamente parecida a su metástasis por paciente.

4.4.6 Cálculo del coeficiente de homogeneidad epigenética

Para estimar el nivel de homogeneidad epigenética intratumoral, calculamos un coeficiente basado en los cambios epigenéticos entre las 3 regiones intratumorales. Se generó el coeficiente denominado “desviación estándar media de los promotores (*SDmean promoter*)”, basado en calcular la desviación estándar (SD) entre las tres regiones intratumorales (TS, CB e IF) para cada paciente. Este coeficiente no tenía en cuenta aquellas CpGs externas a las zonas promotoras (según las regiones promotoras de genes Ensembl, versión Ensembl Genes 75), y CpGs con diferencias de expresión superiores a 0,01 (ANOVA; $P > 0,01$). El valor del coeficiente por paciente se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$SD \text{ mean promoters} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sqrt{\frac{1}{3-1} \sum_{j=1}^3 (\beta_{j,i} - \bar{\beta}_i)^2}$$

donde “N” es el número total de sitios CpG filtrados interrogados en el microarray, “i” es uno de los sitios CpG filtrados, “j” es 1 de las 3 regiones intratumorales (TS, CB e IF), y “ β ” es el valor de la metilación. El valor más bajo del coeficiente indica el mayor nivel de homogeneidad, es decir, menor heterogeneidad intratumoral.

4.4.7 Caracterización histopatológica del tumor

Para llevar a cabo la evaluación de las diferentes zonas tumorales, se utilizó la tinción de hematoxilina-eosina, mediante la observación por microscopio óptico. Este análisis fue supervisado por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Germans Trias i Pujol. Se seleccionaron 3 zonas tumorales por sus diferentes particularidades, tanto por posición dentro del tumor, como por características histológicas: el frente tumoral por ser la zona de invasión del tumor, la zona próxima al tracto digestivo por ser la zona más externa del tumor, y una zona central, para ver la transición entre zonas extremas. Se evaluó que la infiltración estromal e inmunitaria fuera similar en las 3 regiones, y que hubiera al menos un 80% de células tumorales, para no introducir desviaciones que pudieran ser factores de confusión en el posterior análisis epigenético.

Se evaluaron también otras características histopatológicas para que pudieran ser relacionadas con potenciales cambios epigenéticos (Fig.11):

- Características del frente invasivo: frente expansivo vs infiltrante.
- Nivel de “tumor budding” entendido como presencia de células tumorales que se infiltran de manera individual, dando lugar a tumores más agresivos.
- Nivel de inflamación, evaluada por la presencia de linfocitos infiltrantes y necrosis tumoral.

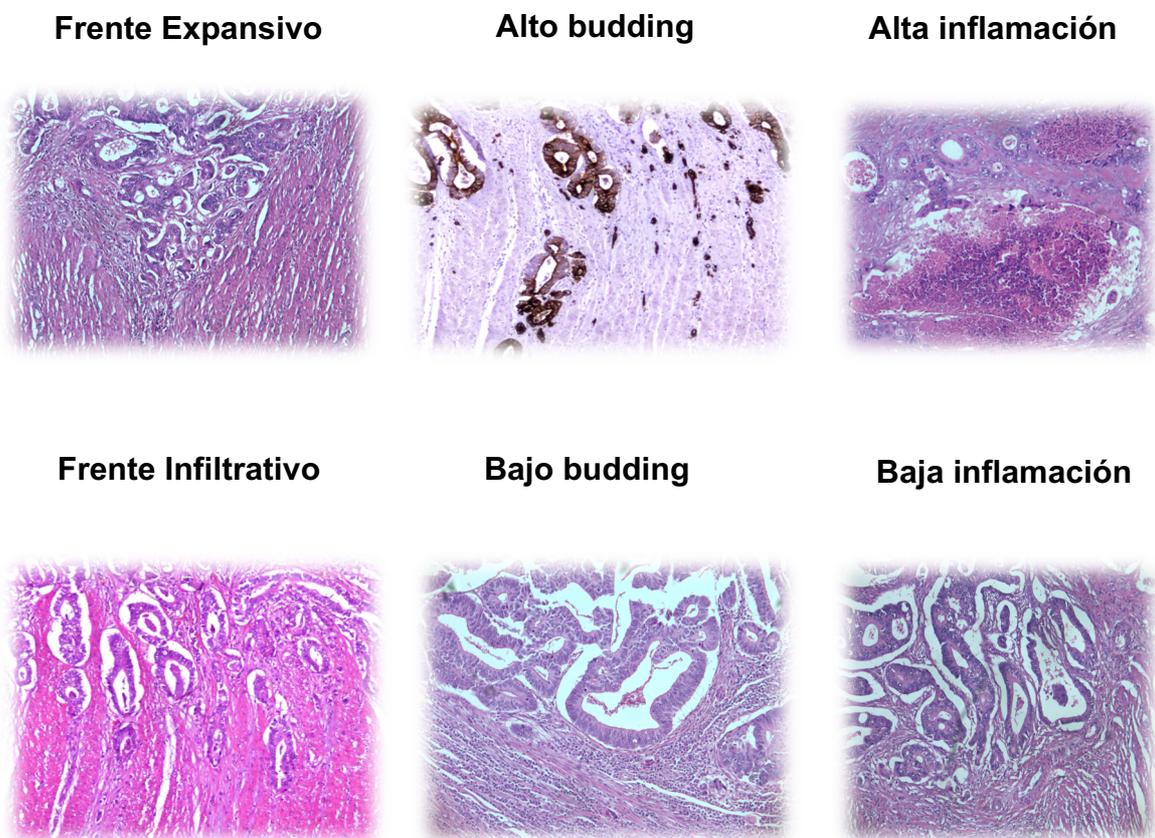


Figura 11. Imágenes de tinción con hematoxilina-eosina al microscopio óptico de las diferentes características histopatológicas evaluadas en las zonas intratumorales.

4.4.8 Análisis mutacional

El estado mutacional de KRAS y BRAF se determinó mediante secuenciación estándar por Sanger utilizando cebadores específicos para genómico ADN

genómico (disponibles a demanda). El análisis mutacional incluyó los codones 12 y 13 para KRAS, y la mutación V600E para BRAF, para las 3 regiones intratumorales diferentes para cada tumor.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La base de datos clínica incluía, todas las variables clínicas, sociodemográficas, histopatológicas y mutacionales, con datos actualizados de supervivencia. Tanto los análisis, como la inclusión de las variables, se hicieron por software SPSS25.

Las asociaciones entre las covariables categóricas se evaluaron mediante el uso del test de X^2 , o la prueba exacta de Fisher, según se requería, considerando una asociación estadística significativa cuando el p-valor era inferior a 0,05.

Las diferencias entre las variables categóricas, y covariables cuantitativas, se evaluaron utilizando la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney, considerando también una asociación estadísticamente significativa cuando el p-valor era inferior a 0,05.

Para evaluar el impacto de las diferencias epigenéticas intertumoraes en el modelo heatmap, las diferencias significativas en la distribución de porcentajes fueron evaluadas mediante el test X^2 de bondad de ajuste. Éste se aplica cuando se tiene una variable categórica de una población única. La prueba determina si una distribución de datos o puntuaciones de una variable nominal (categórica) coincide con las expectativas teóricas para esa distribución.

Para evaluar el impacto del nivel de homogeneidad epigenética intratumoral (EH) en el pronóstico de CCR, realizamos un análisis de supervivencia basados en las curvas de Kaplan-Meier, estimando el efecto del nivel de EH en supervivencia libre de recaídas, y supervivencia global. La homogeneidad epigenética, se calculó utilizando el coeficiente *SD mean promoter* descrito. Se establecieron dos grupos (alto y bajo nivel de homogeneidad), utilizando el cuartil 50 (mediana) de del coeficiente como valor umbral. Las curvas de Kaplan-Meier se extrajeron, y compararon con la prueba Log-Rank, asumiendo significación estadística en p-valores inferiores a 0,05.

Para estudiar el papel del nivel de la homogeneidad epigenética en supervivencia considerando el efecto de otras covariables clínicas, histopatológicas y moleculares, se realizó un análisis multivariado mediante la Regresión de Cox, calculando el riesgo relativo o “hazard ratio” (HR), con un intervalo de confianza del 95%. Se consideraron como factores pronóstico-independientes aquellas covariables con un p-valor inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Objetivo Principal

5.1 Análisis y caracterización epigenética de la heterogeneidad intratumoral espacial: Determinación de las diferencias epigenéticas entre diferentes regiones, y para elucidar su impacto en la naturaleza, y en el pronóstico del tumor

Para ser llevado a cabo, el objetivo principal se divide en tres sub-objetivos:

5.1.1 Datos Descriptivos de la muestra. Recolección de forma retrospectiva, procesamiento de muestras de tumor primario incluidas en parafina, así como sus respectivas metástasis.

Análisis descriptivo de las características: epidemiológicas, clínicas, histopatológicas y moleculares

Este trabajo retrospectivo, comprende la recolección de muestras parafinadas de 79 paciente con CCR (Tabla 3). De todos los pacientes se obtuvo un consentimiento informado para la participación en el estudio. De un total de 23 casos de los 79 tumores primarios, teníamos disponibilidad de metástasis hepáticas pareadas.

- Variables sociodemográficas.

Dentro de las características que se expone en la tabla 3, destacamos: un predominio de varones sobre mujeres (78% versus 22%), un 61% eran pacientes mayores de 60 años.

- Variables clínicas.

Un 60% de los pacientes eran tumores localizados en colon izquierdo y un 20% se presentaban al diagnóstico con enfermedad metastásica.

De los pacientes con muestras pareadas de tumor primario y metástasis hepáticas, un 13% eran sincrónicas, y un 13% eran metacrónicas.

Tabla 3. Características Clínicas e Histopatológicas de la población a estudio

N = 79		N (%)			N (%)
Gender			<u>SURVIVAL PARAMETERS</u>		
	Male	62 (78%)	Relapse		
	Female	17 (22%)	Yes	26 (33%)	
Age			No	45 (57%)	
	< 60	16 (20%)	Unknown	8 (10%)	
	> 60	48 (61%)	Survival status		
	Unknown	15 (19%)	Alive	58 (73%)	
Stage			Exitus	13 (17%)	
	Local disease	63 (80%)	Unknown	8 (10%)	
	Advanced disease	16 (20%)	<u>HISTOPATHOLOGIC PARAMETERS</u>		
Localization			Histology subtype		
	Right colon	31 (39%)	ADK	63 (80%)	
	Left colon	48 (60%)	ADK mucinous or PD	14 (18%)	
MSI status			Unknown / NV	2 (2%)	
	MSS	68 (86%)	Type of IF		
	MSI-H	11 (14%)	Expansive	39 (49%)	
K-Ras status			Infiltrative	36 (46%)	
	Wild-Type	52 (66%)	Unknown / NV	4 (5%)	
	Mutated	16 (20%)	Tumor budding		
	Unknown/NV	11 (14%)	No / Low	54 (69%)	
B-Raf status			Medium / High	20 (25%)	
	Wild-Type	68 (86%)	Unknown / NV	5 (6%)	
	Mutated	11 (14%)	Tumor inflammation		
Liver metastasis			No/Low	45 (57%)	
	Metachronous	13 (16%)	Medium/High	32 (41%)	
	Synchronous	10 (13%)	Unknown/NV	2 (2%)	
	No metastasis / NA	56 (71%)	Tumor necrosis		
Adjuvant Treatment			No/Low	60 (76%)	
	Yes	58 (74%)	Medium/High	14 (18%)	
	No	13 (16%)	Unknown/NV	5 (6%)	
	Unknown	8 (10%)			

MSI-H = microsatellites instability; MSS = stable tumors; NA = no available; NV = no valuable
ADK = adenocarcinoma; PD = poor differentiated; IF = invasive front

A fecha del análisis, un 73% de los pacientes estaban vivos, con un 33% de recaídas.

Recibieron tratamiento adyuvante en un 74% de los casos, basados en la combinación de oxaliplatino y fluoropirimidinas.

- Variables genéticas.

En referencia a las características moleculares analizadas, un 14% de la población presentaba inestabilidad de microsatélites, un 29% presentaba mutación en KRAS, y un 14% mutaciones en BRAF.

- Variables histopatológicas.

Un 80% de las muestras eran catalogadas histológicamente como adenocarcinomas infiltrantes, siendo un 18% mucinosos. El patrón de infiltración tumoral estaba muy equilibrado entre crecimiento expansivo o infiltrativo. Un 69% de los casos mostraron bajo “budding” tumoral, y un 76% mostraron bajo o nulo grado de necrosis tumoral.

- Variables de supervivencia.

Los datos incluídos en el análisis de supervivencia fueron de 71 de los 79 pacientes con CCR, de los que se disponía de datos registrados.

La supervivencia libre de recaída a los 10 años fue del 63,4% (N: 26 recaídas), con una media global en años de 10,18 e intervalo de confianza del 95% de 11,81. No se pudo calcular la mediana porque la supervivencia libre de recaída se mantenía superior al 50%. La curva de supervivencia se representa en la figura 12a.

La supervivencia global a los 10 años fue del 81,7% (N: 13 pacientes exitus), con una media global en años de 11,38 e intervalo de confianza del 95% de 13,60; así como una mediana de supervivencia de 10,96 años, con intervalo de confianza del 95% de 14,26. La curva de supervivencia se representa en la figura 12b

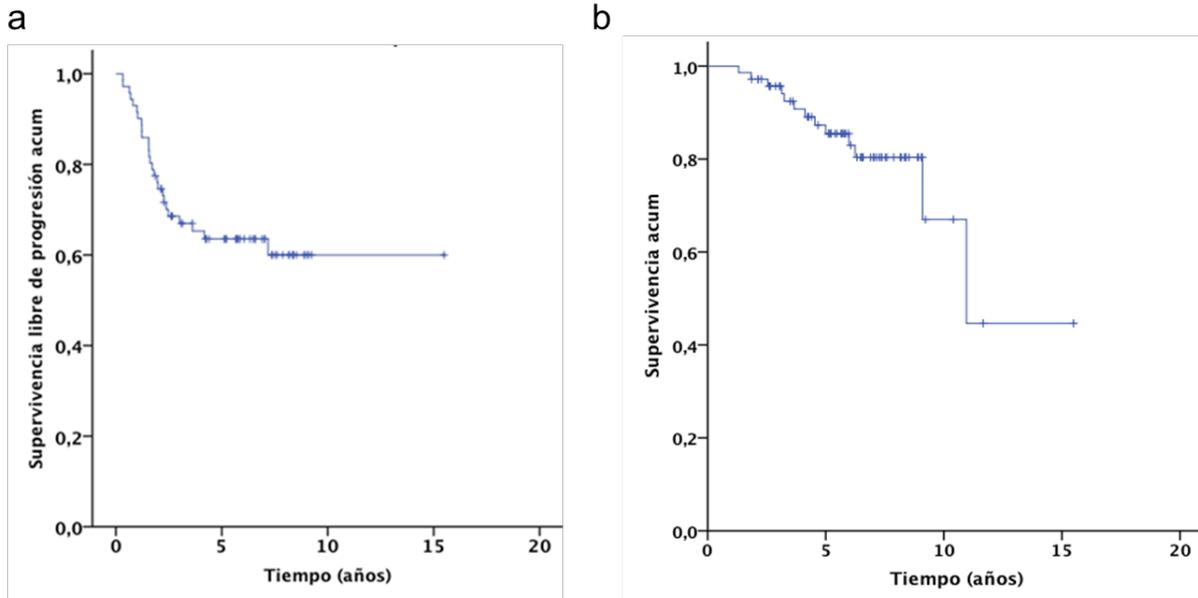


Figura 12 – Curvas de supervivencia de la cohorte de estudio de CCR (N=71; casos de los que se disponía información de los 79 globales) por análisis Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recaída (a) y la supervivencia global (b). En el eje Y se representan los valores de supervivencia acumulada, siendo 1 el 100% de los casos. En el eje X se representa el tiempo de seguimiento en años.

5.1.2 Análisis epigenético de metilación del ADN de tres regiones intratumorales (frente invasivo tumoral, zona cercana al tracto digestivo y zona central) del tumor primario

Se analizaron perfiles de metilación de ADN, interrogando más de 450.000 posiciones CpG, de los 79 tumores primarios de CCR, divididos en tres regiones diseccionadas de cada tumor (Fig.13). Estas tres regiones intratumorales corresponden a: la zona más expuesta al tracto gastrointestinal (TS), una región que se relaciona con la zona media del tumor (CB), y una tercera región correspondiente al frente infiltrativo (IF).

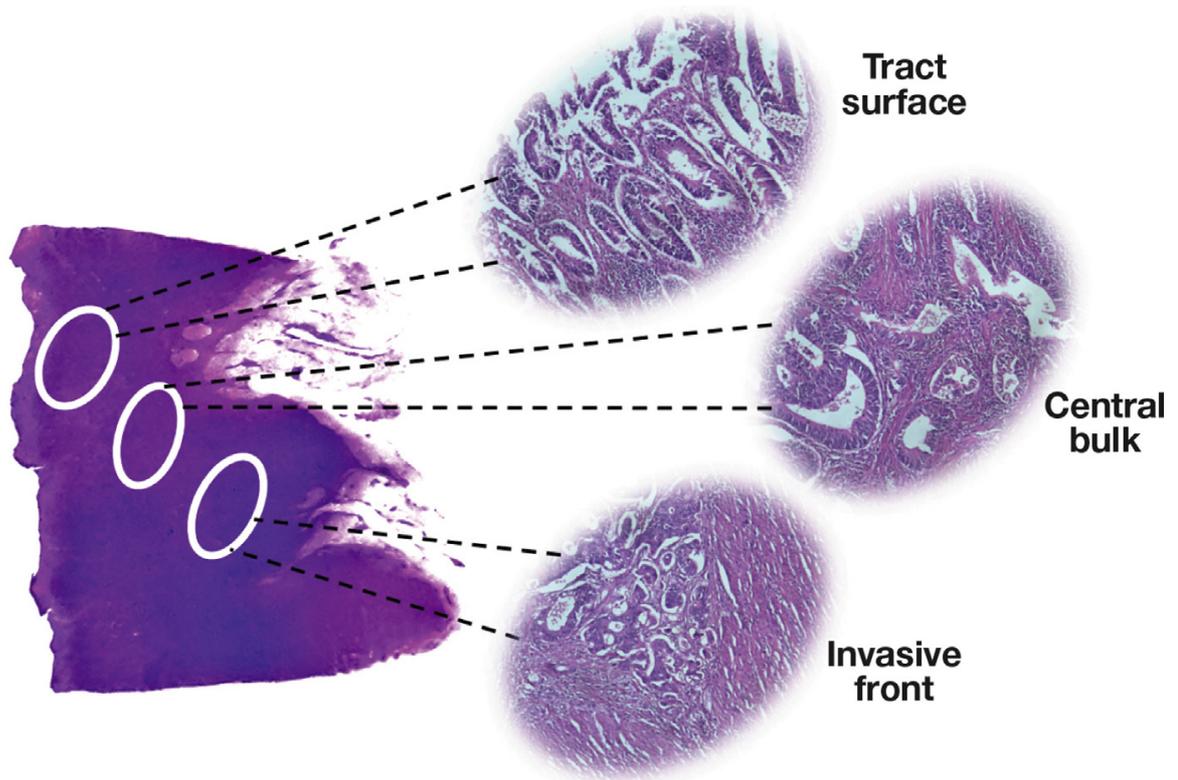


Figura 13. Descripción de las 3 regiones diseccionadas de cada tumor. TS (*Tract Surface*) zona expuesta al tracto gastrointestinal, CB (*Central bulk*) zona central de la masa tumoral e IF (*Invasive front*) que corresponde al frente infiltrativo como zona más externa del tumor.

Después del análisis de datos procedentes del análisis de metilación de ADN diferencial entre las tres zonas intratumorales, se observó que globalmente, había un patrón común de metilación entre las tres regiones estudiadas, donde el 91% de las posiciones CpGs interrogadas, tenían similares niveles de metilación, observándose sólo en un 9% de ellas, un patrón de metilación diferencial, entre las regiones intratumorales, y concluyendo que el nivel de heterogeneidad epigenética intratumoral en esta población es bajo, aunque existente. Teniendo en cuenta este 9% de posiciones CpG variables, y considerando los casos de forma global, la zona intratumoral más epigenéticamente divergente era el frente invasivo (Fig. 13).

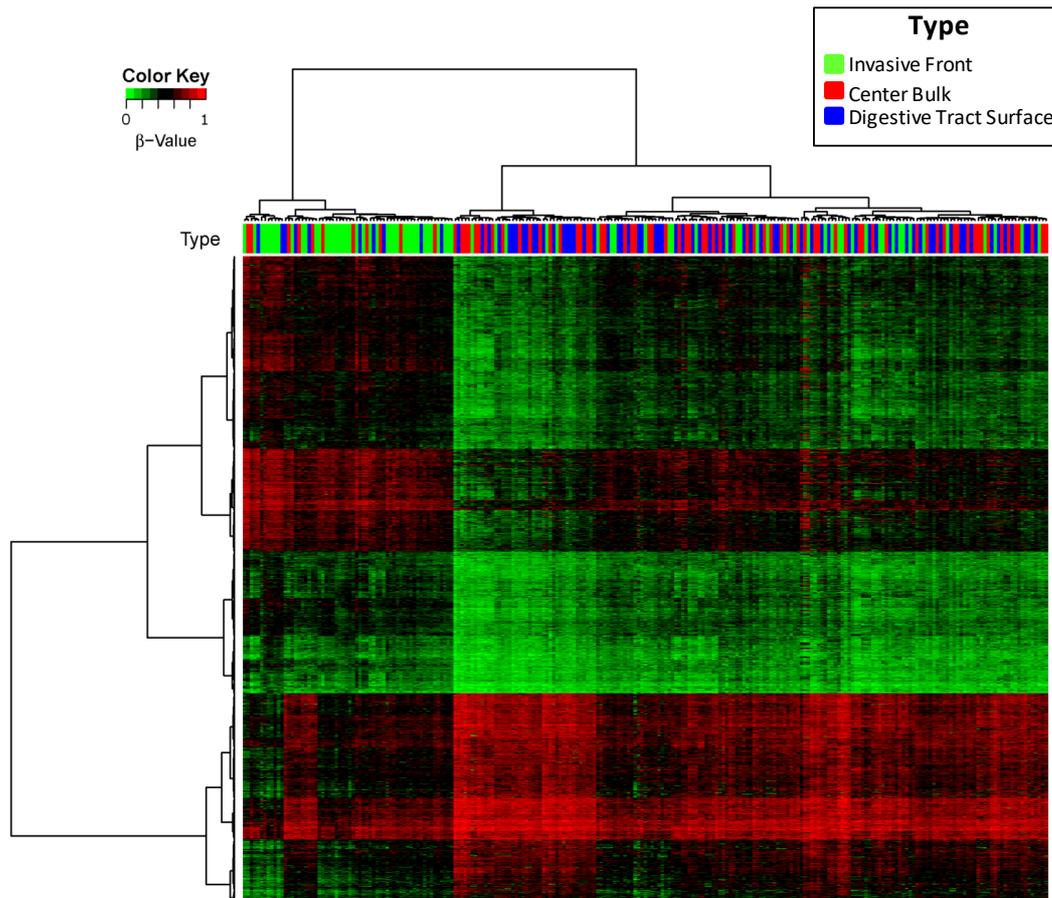
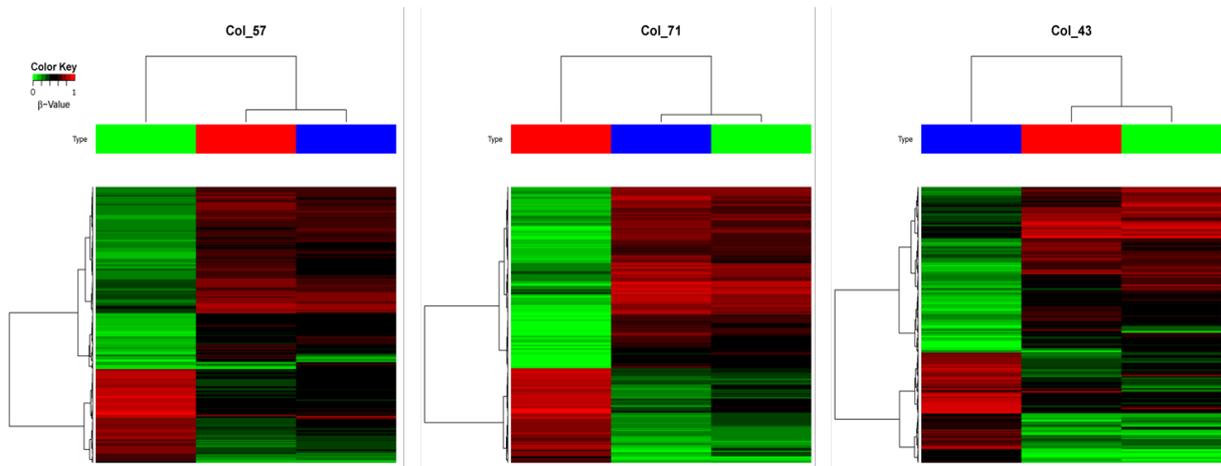


Figura 13. Representación en heatmap del análisis supervisado comparativo entre las las 3 regiones intratumorales (código de colores arriba) en la población global (N = 79), mediante distancias Manhattan y sitios CpG situados en zonas promotoras. Las diferencias intra-regiones fueron valoradas mediante test ANOVA (FDR < 0.01, $\Delta\beta > 0.10$).

En otra aproximación, y con el objetivo de determinar en qué proporción de pacientes era el IF la zona más divergente, y si había casos en las que lo era una de las otras zonas, el análisis se dirigió a valorar, de forma individualizada para cada paciente, el nivel de divergencia epigenética entre regiones, mediante un análisis supervisado (Fig.14a). Como resultado, el frente invasor era, en un 49% de los pacientes, la región más epigenéticamente diferente. No obstante, las regiones TS, y CB fueron las más divergentes en un 25% de los casos respectivamente, demostrando que la región IF era la más predominantemente divergente, pero no de forma única (Fig 14b).

a



b

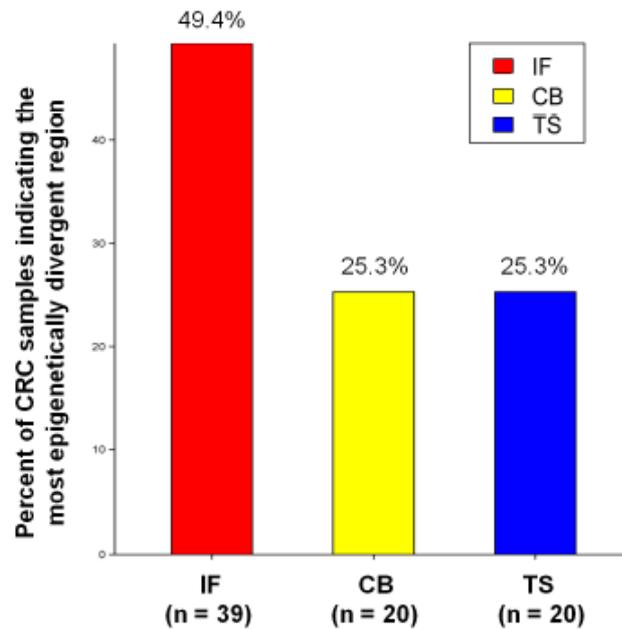


Figura 14. Análisis individual de la divergencia entre 3 regiones intratumorales. a) Representación gráfica ejemplo de 3 pacientes clasificados según la región intratumoral más divergente (izquierda = frente invasor; centro = zona central; derecha = superficie de tracto digestivo), calculada usando el 1% de las CpG en zonas promotoras más variables, de forma aleatoria. b) Representación gráfica del porcentaje de muestras clasificadas según qué región intratumoral es la más divergente. Se muestran en colores: en rojo el frente invasor (IF), en amarillo la masa tumoral central (CB) y en azul, la superficie de tracto digestivo (TS).

5.1.3 Análisis de datos y evaluación de asociación con el pronóstico, así como de otros parámetros clínico-patológicos

Para determinar de forma cualitativa si el hecho que una zona intratumoral determinada fuera la más epigenéticamente diferente, podía tener un papel en la evolución de la enfermedad, se realizó un análisis de supervivencia, no mostrando valor pronóstico. Con el fin de estudiar su posible impacto en el pronóstico de estos pacientes, el nivel de heterogeneidad fue transformado a nivel cuantitativo, mediante la generación del coeficiente de homogeneidad epigenética (EH), que mide el grado de diferencias en los niveles de metilación entre regiones, de forma numérica, independientemente de cuál fuera la zona intratumoral más divergente. Este coeficiente se basa en el cálculo de la desviación estándar de los valores de metilación de las posiciones CpG en zonas promotoras, entre las tres regiones intratumoral es para cada paciente. Mediante un análisis de supervivencia a través de curvas Kaplan-Meier, se determinó que los pacientes de CCR con enfermedad loco regional, con fenotipo MSS y sin mutaciones en BRAF, y un alto coeficiente de homogeneidad epigenética (es decir, baja heterogeneidad), presentaban una peor supervivencia libre de progresión, y una reducida supervivencia (Fig. 15). Finalmente, la N fue de 50 pacientes. Los pacientes que presentaban fenotipo MSI fueron excluidos, ya que sus niveles de metilación globales eran superiores a los tumores MSS, debido a su naturaleza hipermetiladora. También se estratificó por estadio (locoregional vs avanzado), ya que se trataba del factor pronóstico más potente, eliminando así del análisis los pacientes con estadio avanzado, que además eran muestras seleccionadas de las que se disponía tejido de la metástasis pareada y podían introducir un sesgo. De acuerdo con los modelos multivariados de regresión de Cox, una alta homogeneidad epigenética (baja heterogeneidad), mostraba ser un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión en la cohorte con enfermedad locoregional (Fig. 16).

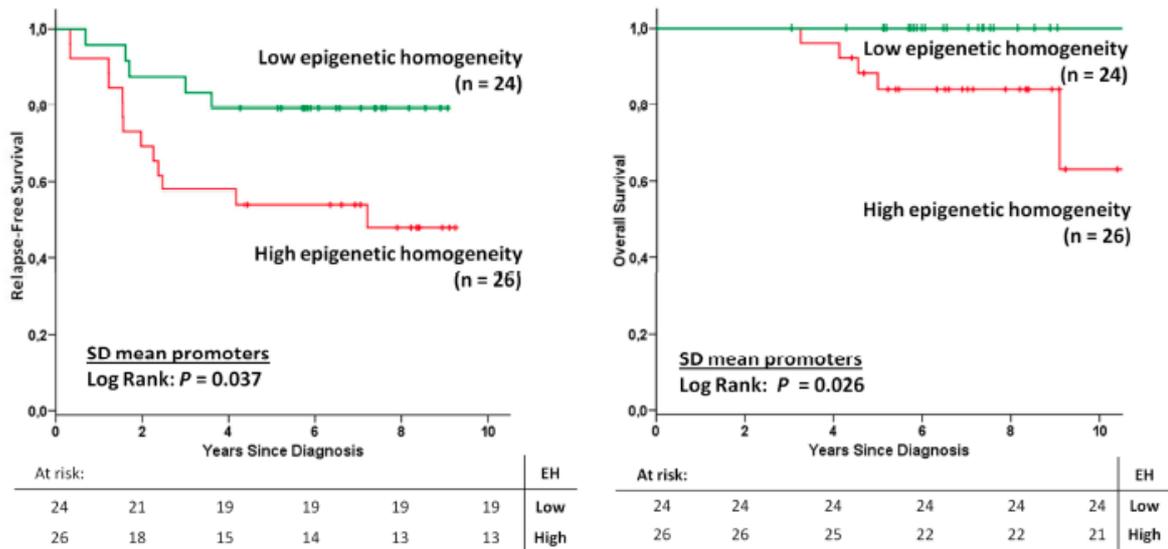


Figura 15. Impacto pronóstico de la homogeneidad epigenética en CCR. Análisis Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recaída (izquierda) y supervivencia global (derecha) entre pacientes con enfermedad locoregional (N=50), cuyos tumores eran fenotipo MSS, de acuerdo con el coeficiente de homogeneidad epigenética. El p-valor corresponde a la función Log-Rank, considerando un p-valor menor a 0,05 como estadísticamente significativo.

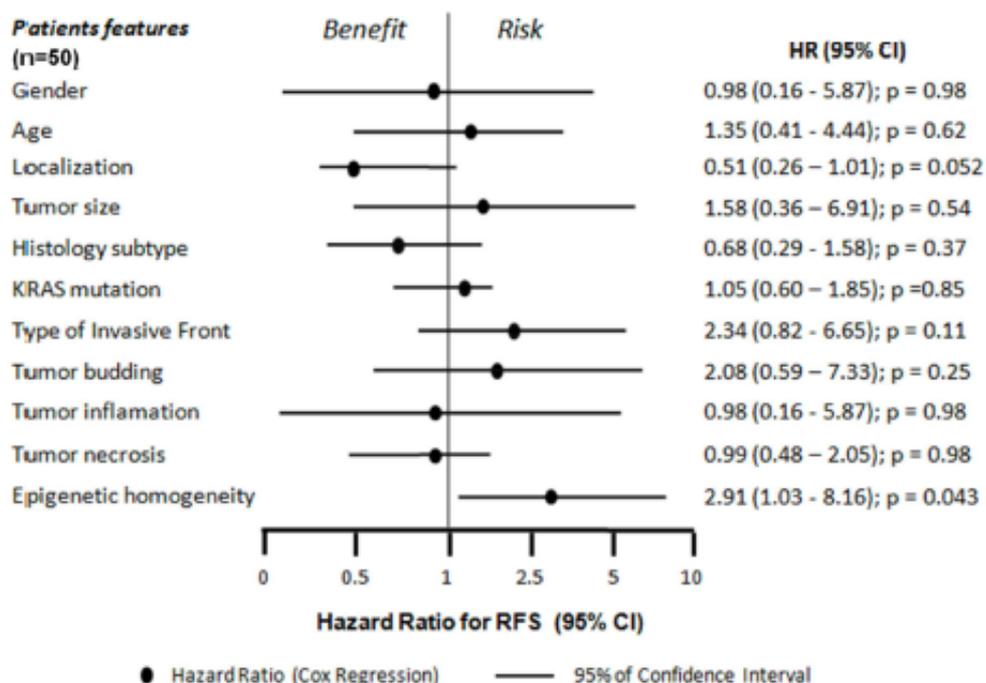


Figura 16. Forest plot del análisis multivariado por regresión de COX, teniendo en cuenta diferentes variables clínicas e histopatológicas en la misma población locoregional (N=50). Los p-valores corresponden al riesgo relativo (Hazard Ratio), y los parámetros con p-valores menores a 0,05 fueron considerados como factores pronóstico independientes.

Tabla 4. Asociación entre variables y coeficiente de homogeneidad en la cohorte seleccionada para el estudio de supervivencia.

N = 50	N (%)	SDmean promoters*			
		Low EH	High EH	P**	
Gender					
	Male	45 (90%)	22 (49%)	23 (51%)	0.54
	Female	5 (10%)	2 (40%)	3 (60%)	
Age					
	<60	16 (32%)	10 (62%)	6 (38%)	0.23
	>60	34 (68%)	14 (41%)	20 (59%)	
Localization					
	Right colon	19 (38%)	9 (47%)	10 (53%)	0.94
	Left colon	31 (62%)	15 (48%)	16 (52%)	
KRAS status					
	Wild-Type	35 (70%)	20 (57%)	15 (43%)	0.07
	Mutated	15 (30%)	4 (27%)	11 (73%)	
Histology subtype					
	ADK	38 (76%)	17 (45%)	21 (55%)	0.69
	ADK mucinous or PD	10 (20%)	6 (60%)	4 (40%)	
	Unknown / NV	2 (4%)	1 (50%)	1 (50%)	
Type of Invasive Front					
	Expansive	21 (42%)	13 (62%)	8 (38%)	0.21
	Infiltrative	25 (50%)	9 (36%)	16 (64%)	
	Unknown / NV	4 (8%)	2 (50%)	2 (50%)	
Tumor Budding					
	No / Low	32 (64%)	15 (47%)	17 (53%)	0.85
	Medium / High	13 (26%)	7 (54%)	6 (46%)	
	Unknown / NV	5 (10%)	2 (40%)	3 (60%)	
Tumor Inflammation					
	No / Low	29 (58%)	13 (45%)	16 (55%)	0.87
	Medium / High	19 (38%)	10 (53%)	9 (47%)	
	Unknown / NV	2 (4%)	1 (50%)	1 (50%)	
Tumor Necrosis					
	No / Low	40 (80%)	18 (45%)	22 (55%)	0.61
	Medium / High	6 (12%)	4 (67%)	2 (33%)	
	Unknown / NV	4 (8%)	2 (50%)	2 (50%)	
Relapse					
	yes	18 (36%)	5 (28%)	13 (72%)	0.042
	no	32 (64%)	19 (59%)	13 (41%)	
Survival status					
	Alive	44 (88%)	24 (55%)	20 (45%)	0.023
	Exitus	6 (12%)	0 (0%)	6 (100%)	

**Heterogeneity coefficient based in Silhouette method considering Manhattan distances among intra-tumor sections and of other samples.

**p-value from Chi-Square and Fisher's test; p-value under 0.05 is considered as statistical significant

EH = Tumor Epigenetic Homogeneity; MSI-H = microsatellites instability; MSS = stable tumors; NA = No available

La asociación entre las características clínicas, histopatológicas y moleculares de la cohorte seleccionada (N=50) en relación con el coeficiente de homogeneidad epigenética, dicotomizado en alto o bajo, según el valor de la mediana, se representa en la tabla 4, no encontrándose asociaciones estadísticamente significativas, excepto en supervivencia: los casos con alto EH presentaban mayor número de recaídas y más eventos de muerte.

5.2 Objetivos Secundarios

5.2.1 Análisis y caracterización epigenética de la heterogeneidad intertumoral: Determinar si las diferencias epigenéticas entre diferentes tumores colorectales son superiores a las existentes entre las diferentes regiones intratumorales

Analizamos el perfil de metilación de más de 450.000 islas CpG, en las tres regiones mencionadas previamente de cada uno de los 79 pacientes. En un primer análisis no supervisado, mediante la representación por aglomeración jerárquica en heatmap, a partir del cálculo de distancias Manhattan, se observó que cada una de las tres regiones tumorales diseccionadas preferentemente se agrupaban dentro de cada paciente (66%; 52 de 79). Esto se tradujo en concluir que la heterogeneidad intertumoral era significativamente mayor que la intratumoral (Fig. 17).

Para comprobar que estas diferencias en heterogeneidad epigenética intertumoral, no eran debidas a artefactos introducidos por la presencia de tejido sano, se analizaron 20 muestras de mucosa sana de tejido colorectal, que se agruparon de forma conjunta formando un grupo o “cluster”, y demostrando que las muestras tumorales no estaban enriquecidas en tejido sano y que, por tanto, las diferencias se debían al tejido tumoral. Además, se observó una agrupación de muestras en “cluster” que mostraban un perfil epigenético diferencial al resto de tumores. Se trataba de las muestras con fenotipo MSI que, como se ha comentado, tienen fenotipos hipermetilados, a diferencia que las muestras MSS.

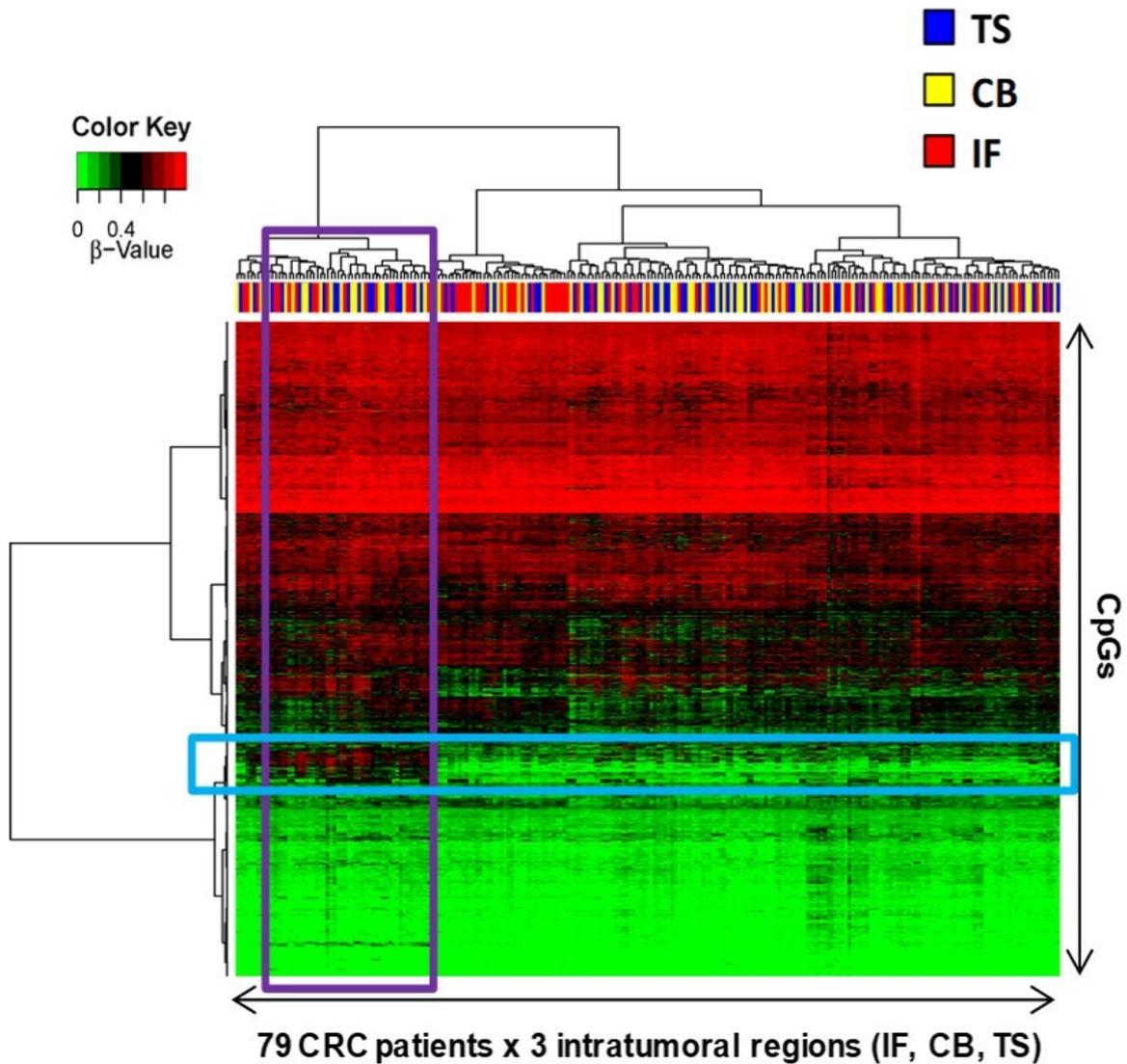


Figura 17. análisis no supervisado del total de regiones intratumorales ($n=237$) de los 79 pacientes, usando la aglomeración jerárquica, por el método de distancias de Manhattan. Representación aleatoria en heatmap del 1% de las islas CpG interrogadas mediante Illumina Infinium HumanMethylation450 beadchip. Las regiones codificadas en color como: Azul (TS), amarillo (CB) y rojo (IF). Enmarcado en lila se muestra el cluster correspondiente a los tumores fenotipo MSI, con un fenotipo hipermetilado, diferencial al resto de tumores (CpGs asociadas al fenotipo MSI, marcadas en el cuadro azul claro).

5.2.2 Análisis de la heterogeneidad intratumoral temporal

5.2.2.1 Determinar qué región del tumor primario es más epigenéticamente similar a su metástasis asociada

Se analizó qué región intratumoral era más parecida en cada uno de los casos de los que se tenía las metástasis hepáticas pareada de nuestra serie (N=23). En un análisis supervisado de cada sección intratumoral dentro de cada caso (Fig. 18), incluyendo su metástasis correspondiente. Observamos que la región más frecuente del tumor primario, que se parecía más epigenéticamente a su metástasis (compartía más eventos de metilación), era la superficie en contacto con el tracto digestivo TS (43%), seguida por IF (30%) y CB (26%) (Fig. 19). Similares resultados se obtuvieron al estratificar el análisis r entre las metástasis sincrónicas (10), y metacrónicas (13) (Fig. 20). Para hacer la agrupación en “clusters” en los heatmaps individuales, sólo se tuvieron en cuenta el 9% de posiciones CpG que habían mostrado diferencias significativas de metilación, de forma aleatoria.

5.2.2.2 Correlación de estos datos, con parámetro clínicos y patológicos

Se analizó si la similitud epigenética entre tumor primario y su metástasis, estaba asociada a variables clínicas, histopatológicas o mutacionales. Para evaluar la homogeneidad epigenética entre el tumor primario y su metástasis, se calculó la distancia Euclídea, a nivel de los heatmaps generados, entre la metástasis, y la región intratumoral con más semejanza a esta, independientemente de la que fuera, estableciendo un coeficiente de valor cuantitativo. Se concluyó, que no había una asociación significativa entre las variables clínicas (edad, sexo, localización, estadio), histopatológicas (tipo histológico, tipo de frente invasor, grado de inflamación, presencia de “budding” tumoral y grado de necrosis), y el estado mutacional (mutaciones en KRAS) con el grado de semejanza epigenética entre tumor y metástasis pareada. (Fig. 21-23).

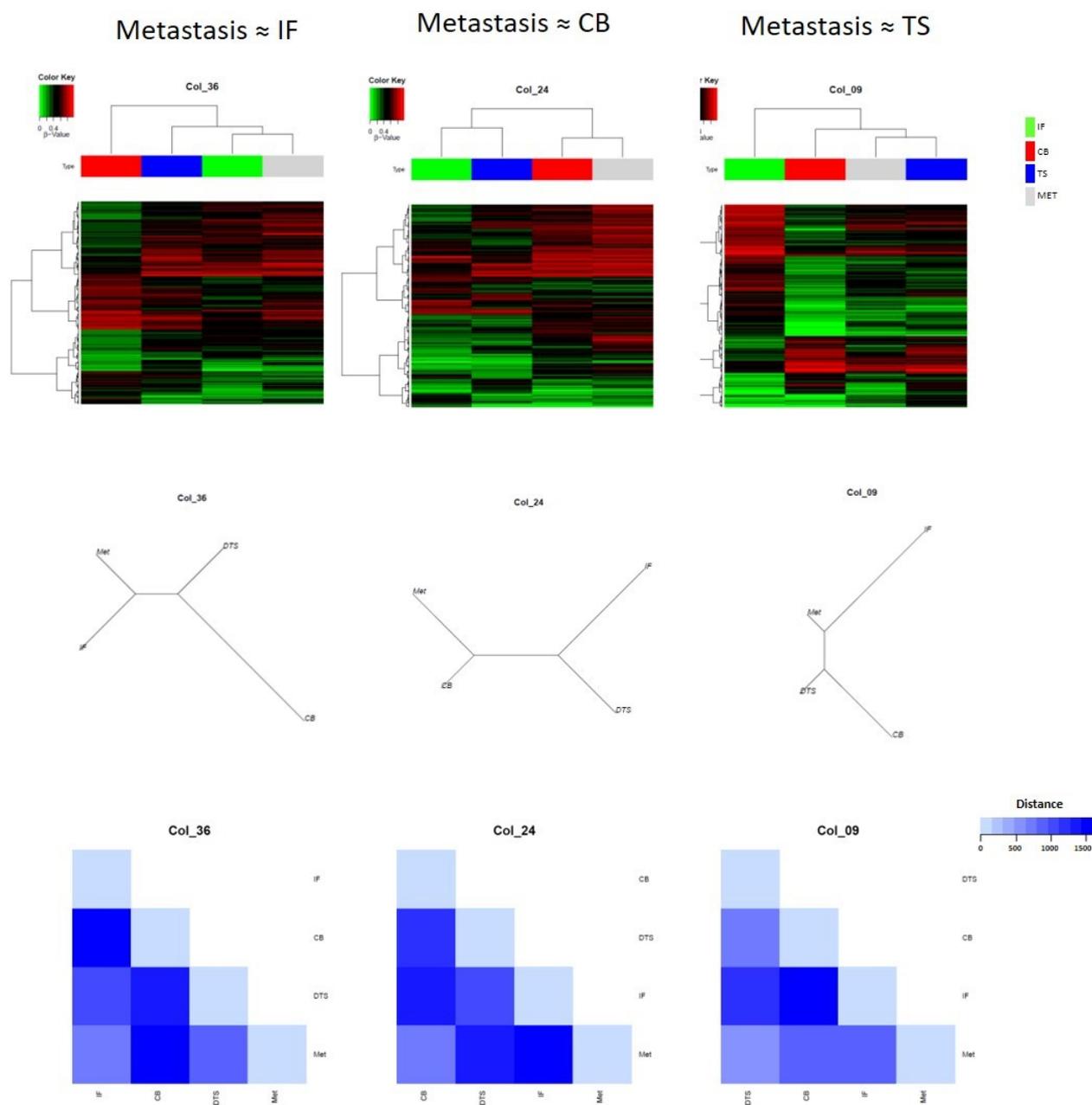


Figura 18: Diferentes representaciones gráficas del análisis individual (por paciente) del origen de las metástasis, usando la distancia euclídea entre las 3 regiones intratumorales del tumor primario y su metástasis, calculada a partir del 1% de las CpGs en zonas promotoras más variables. Se muestran, como ejemplo, 3 casos, según la región intratumoral más epigenética semejante a la metástasis (columna izquierda = frente invasivo; columna central = zona central; columna derecha = superficie del tracto digestivo) usando 3 representaciones gráficas diferentes: fila superior = representación mediante heatmap; fila central = árboles que representan la distancia euclídea entre zonas; fila inferior = representación gráfica según la cual el color más claro representa la zona intratumoral más cercana a la metástasis.

Metástasis similar a...	n	%
Invasive Front (IF)	7	30.4%
Center Bulk (CB)	6	26.1%
DigestiveTract Surface (TS)	10	43.5%
Total	23	

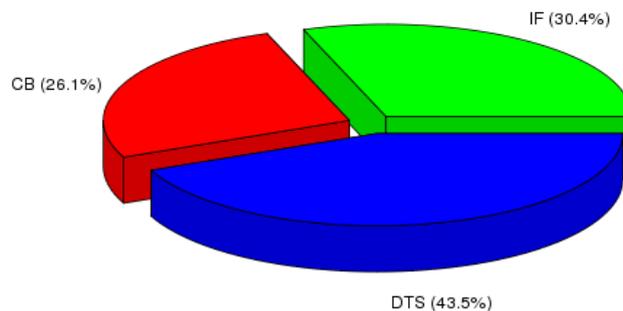


Figura 19. Análisis individual (por paciente) del origen de las metástasis, usando la distancia euclídea entre las 3 regiones intratumorales del tumor primario y su metástasis. Representación gráfica del porcentaje de muestras clasificadas según qué región intratumoral es la más semejante a su metástasis. Se muestran en colores: en rojo el frente invasor (IF), en amarillo la masa tumoral central (CB) y en azul, la superficie de tracto digestivo (TS).

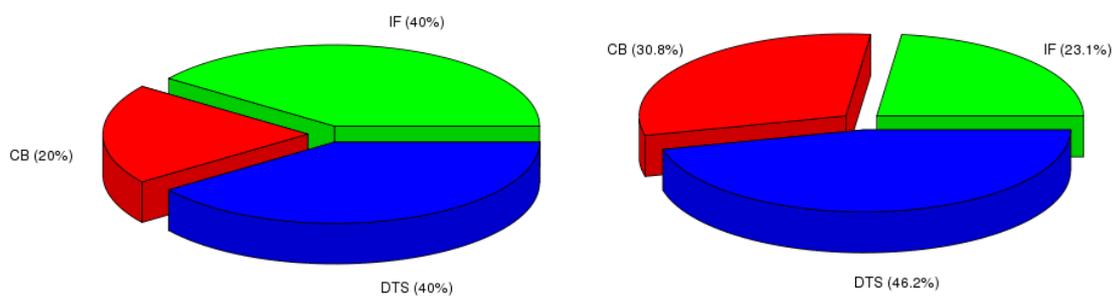


Figura 20. Porcentaje de regiones intratumorales que se parecen más epigenéticamente a la metástasis, divididas entre metástasis sincrónicas (izquierda) o metacrónicas (derecha).

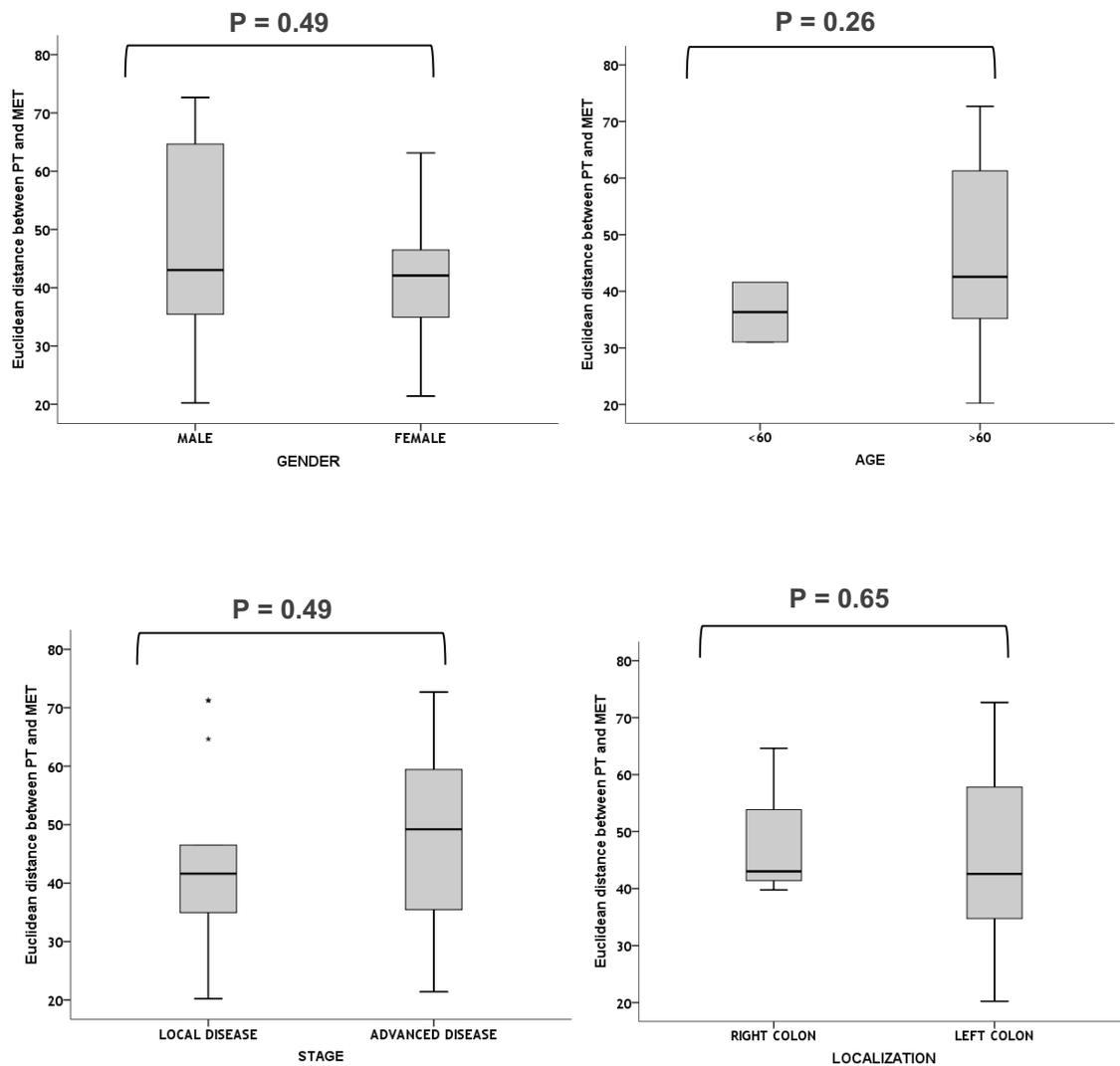


Figura 21. Asociación de variables clínicas con perfil epigenético de tumor primario y metástasis pareada. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test U de Mann-Whitney, considerando un p-valor inferior a 0,05 como estadísticamente significativo.

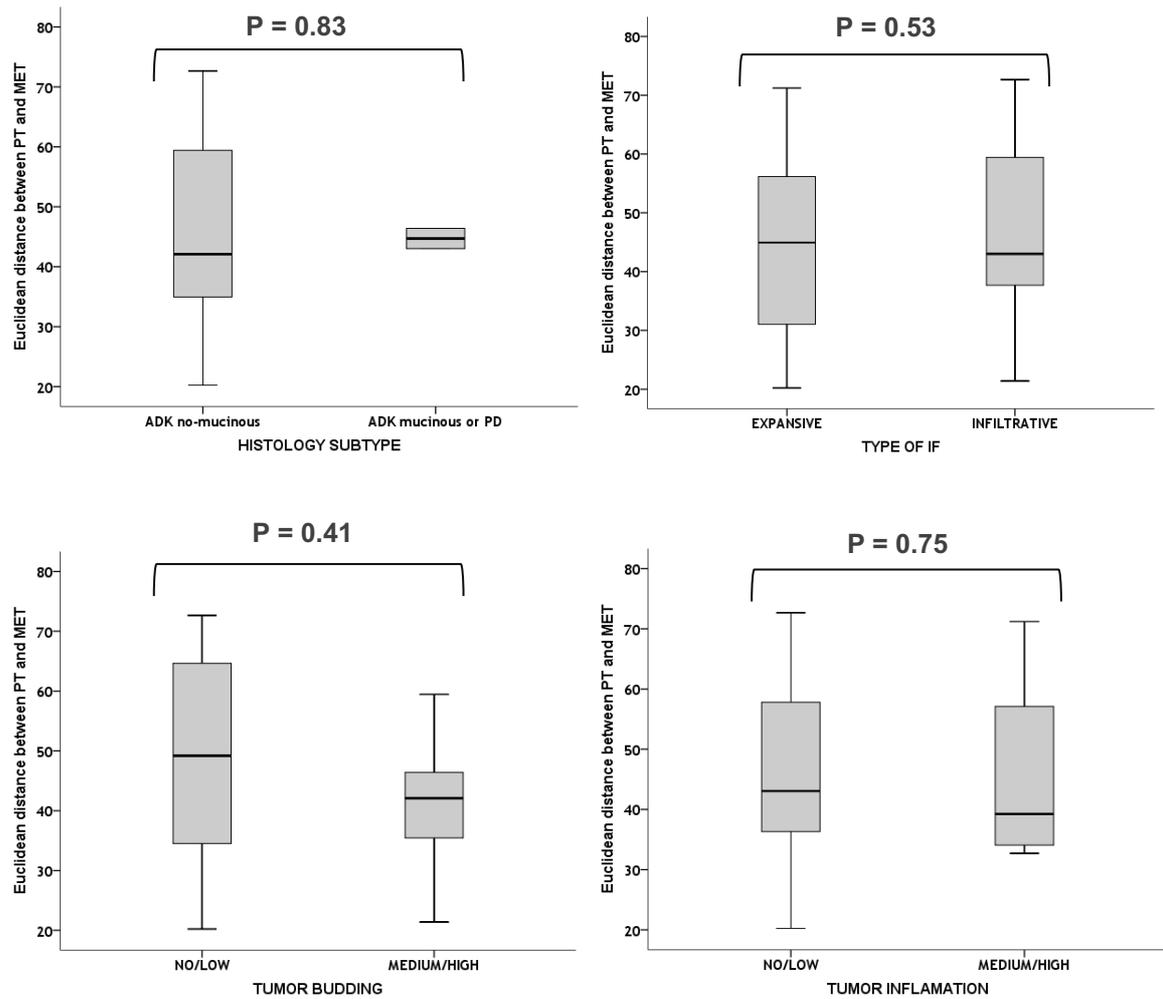


Figura 22. Asociación de variables histopatológicas con perfil epigenético de tumor primario y metástasis pareada. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test U de Mann-Whitney, considerando un p-valor inferior a 0,05 como estadísticamente significativo.

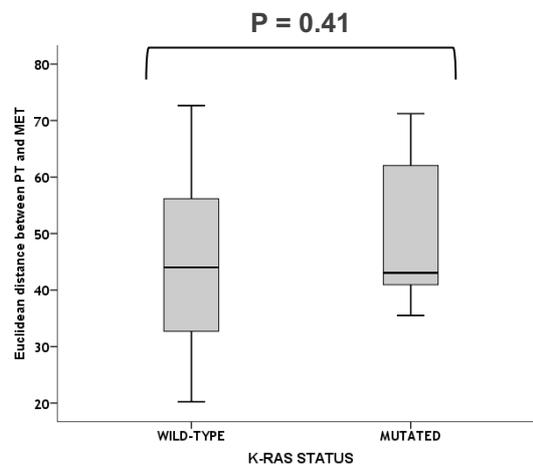


Figura 23. Asociación de variables genéticas con perfil epigenético de tumor primario y metástasis pareada. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test U de Mann-Whitney, considerando un p-valor inferior a 0,05 como estadísticamente significativo.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSION

6.1 Discusión de datos clínicos

Las variables sociodemográficas de la población analizada, como son la edad, la localización tumoral y el número de pacientes que reciben tratamiento adyuvante, son equiparables a otros estudios publicados en la literatura, dónde la edad media de presentación son los 65 años, predominando los tumores de colon izquierdo sobre los tumores de colon derecho, y dónde reciben por encima del 70% tratamiento adyuvante¹⁸¹. En este aspecto, hemos de recalcar que el hecho que más de la mitad de los pacientes incluidos en el estudio realicen tratamiento adyuvante, define a esta cohorte como de alto riesgo de recaída. La variable sexo, con un 78% de varones, sí que parece distar de las series publicadas, donde normalmente existe un equilibrio porcentual entre ambos sexos, con ligero predominio del masculino.

Respecto al análisis de mutaciones de los casos de nuestra serie, se tiene que constatar que es una cohorte enriquecida de pacientes con mutaciones en BRAF, representando un 14% de casos. La presencia de mutaciones en BRAF es un factor indicador de mal pronóstico, que se presenta normalmente entre un 8-10% de los casos de CCR, y en nuestra serie este porcentaje sería algo mayor. Por el contrario, la presencia de fenotipo MSI en tumores localizados es un factor de buen pronóstico, objetivándose en un 14% de los casos de forma global, en la misma línea que en nuestra cohorte de estudio¹⁸². Se hipotetiza que la coexistencia del fenotipo MSI con la mutación de BRAF en el mismo tumor, que serían los denominados adenocarcinomas serrados, compensa el efecto deleterio de la mutación con el pronóstico positivo del otro, siendo su frecuencia de coexistencia en estudios publicados muy similar al porcentaje en la presente cohorte (14%)¹⁸³. Respecto a la presencia de mutaciones en KRAS, en la cohorte de estudio se observan en porcentaje menor (29%) que las reportadas en la literatura (40%)⁹⁹⁻¹⁰⁸. Subrayando que la presencia de esta mutación es un factor de mal pronóstico, y el bajo porcentaje en nuestra serie, nos hace confirmar nuestros resultados en datos de supervivencia obtenidos en el estudio de nuestra población, que señalan a una

cohorte de pacientes con mejor pronóstico de lo esperado por ser una cohorte de alto riesgo de recaída⁶³⁻⁷⁰.

En el CCR, entre 60-70% de los pacientes son diagnosticados con enfermedad localizada, y el resto, 30-40%, debutan con enfermedad metastásica. De los que debutan como tumores localizados, la mitad desarrollarán metástasis durante su seguimiento. La supervivencia global en pacientes con enfermedad avanzada que se intervienen de metástasis hepáticas tras realizar un tratamiento neoadyuvante es del orden 50% a los 8 años¹⁸⁴. Con estas premisas, se puede advertir que nuestra población de estudio está sesgada. Se tiene que tener en cuenta que se trata de una cohorte retrospectiva, en la que muchos casos no fueron seleccionados de forma aleatoria, ya que, para hacer los estudios moleculares comparativos, se necesitaba tener grupos balanceados para cada variable de estudio. Además, era necesaria la presencia de casos de enfermedad avanzada de los que se poseía la muestra de la cirugía del tumor primario y de la metástasis, con aproximadamente la mitad de los casos con enfermedad metastásica al diagnóstico (sincrónicas) y la mitad con metástasis que aparecieron de forma metacrónica.

Con todo esto, nuestra población presenta una incidencia menor de la esperada con características de mal pronóstico, ya metastásica en el diagnóstico pero, con un número limitado de metástasis hepáticas, un mayor porcentaje de pacientes con lesiones hepáticas metacrónicas, hasta recordar, que de nuestra serie las metástasis hepáticas operadas, no habían recibido tratamiento sistémico; todo ello hace que la muestra del estudio, si bien se presentan con enfermedad metastásica, son un grupo seleccionado de mejor pronóstico, que la que observamos en la práctica clínica diaria. Se seleccionaron esos casos, porque se pretendía hacer el estudio de heterogeneidad epigenética entre tumor primario y metástasis, sin la presión selectiva que pudiera ejercer un tratamiento. Esta fue también una de las razones por la que la población metastásica, no se incluyó en el estudio del efecto pronóstico de la homogeneidad epigenética tumoral, teniendo sólo en cuenta la enfermedad locoregional, en la que no existía un sesgo tan evidente.

Esto en conjunto, puede justificar los datos de supervivencia, en una población que difícilmente podríamos analizar hoy, dado que actualmente casi el global de

pacientes realizan tratamiento quimioterápico neoadyuvante antes de ser intervenidos de las lesiones metastásicas, y esto le da un interés como cohorte de estudio de la evolución epigenética desde el tumor primario a la metástasis, producido por la misma naturaleza de la enfermedad, sin la selección clonal producida por la terapia.

6.2 Discusión sobre la Heterogeneidad tumoral y su impacto en oncología

El CCR se considera una enfermedad heterogénea, que se genera de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, implicadas en diversos procesos de carcinogénesis, donde un epitelio de colon normal, se transforma en una lesión preneoplásica, hasta convertirse en carcinoma, llegando a ser un tumor infiltrante¹⁸⁵. La identificación de todos estos eventos moleculares que conducen a la formación de un tumor, se considera muy relevante, tanto a nivel de diagnóstico como terapéutico, en el ámbito actual de la medicina personalizada.

Del esfuerzo en la realización de estudios de secuenciación masiva en diferentes tumores para identificar la diversidad de vías carcinogénicas, donde se han identificado cientos de mutaciones conductoras, así como otras aberraciones genómicas, se ha podido objetivar la extensión de la diversidad molecular tumoral, no sólo entre tumores de diferentes pacientes (heterogeneidad intertumoral), sino dentro del mismo paciente (heterogeneidad intratumoral). La heterogeneidad intertumoral a nivel morfológico, ya ha sido ampliamente demostrada por las observaciones histopatológicas del tumor, así como a nivel cromosómico, mostrada mediante análisis citogenéticos. No obstante, el interés no sólo se centra en conocer cuáles son los mecanismos conductores de un tumor, sino entender los cambios producidos en el momento de aparición de lesiones metastásicas durante la evolución del tumor, dado que estos cambios pueden tener un impacto tanto en la respuesta terapéutica, como en el pronóstico de este. Por tanto, hay una necesidad de entender la historia evolutiva del tumor, disponiendo de información molecular, tanto en el espacio como en el tiempo, para poder identificar todos los procesos moleculares que contribuyen al inicio, mantenimiento, progresión y diversificación del tumor.

La heterogeneidad intratumoral, ya sea temporal (entre tumor primario y metástasis) o espacial, puede tener importantes implicaciones, formándose clonas molecularmente heterogéneas por mecanismos intrínsecos celulares como la inestabilidad genómica, la inestabilidad de microsatélites o alteraciones epigenéticas de regulación génica, o creada a través de la administración de tratamientos sistémicos contra el tumor, que condicionan la aparición de clonas resistentes seleccionadas bajo presión longitudinal de este.

La presencia de heterogeneidad intertumoral, principalmente a nivel genético, pero también epigenético, ya ha sido demostrada, y ha hecho posible disponer de un consenso de subtipos moleculares en el CCR que lo refrendan¹³³. En cambio, la heterogeneidad intratumoral ha sido menos estudiada, entendiéndola como alteraciones moleculares diferenciales en diferentes clones celulares dentro de cada masa tumoral, y su contribución en la generación de mecanismos de resistencia a tratamientos, en el proceso de invasión, migración y de metástasis, que condiciona su impacto pronóstico en la evolución de la enfermedad.

Ya que el papel de la genómica en la heterogeneidad tumoral ha sido más ampliamente descrito, esta tesis se ha centrado en estudiar el impacto en la evolución tumoral de la heterogeneidad intratumoral a nivel epigenético, por su papel clave en la regulación génica, y en la diferenciación celular y tisular.

En resumen, la mayoría de los estudios sobre heterogeneidad tumoral se han centrado en la genómica, demostrando la presencia de distintos perfiles mutacionales, entre diferentes regiones del tumor primario, y sus metástasis, o incluso metástasis diferentes del mismo paciente, por tanto, evidenciando una heterogeneidad genética¹⁸⁶⁻¹⁸⁷. Estas variaciones en los perfiles mutacionales, han demostrado un valor pronóstico, y predictivo de respuesta a varios tratamientos dirigidos. El ejemplo más evidente en CCR, es el uso de agentes dirigidos al bloqueo extracelular del receptor EGFR (agentes anti-EGFR), en pacientes con CCR con las proteínas de la familia RAS nativas, dónde se objetiva, que menos de la mitad de los pacientes responden a esta terapia, indicándonos que podría existir un mecanismo de resistencia intrínseco, causado por una heterogeneidad intratumoral asociada a la presencia de un bajo porcentaje de clonas celulares con

mutaciones en *KRAS*, o en otros efectores de la vía MAPK, que dan refractariedad celular a este tratamiento¹⁸⁸.

En CCR se ha descrito que, diversas mutaciones somáticas en el gen que codifica para la proteína *KRAS*, están asociadas a la adquisición de resistencia al tratamiento con anticuerpos dirigidos contra EGFR, a lo largo del cual, por monitorización no invasiva mediante ADN tumoral circulante (ADNtc), durante la adquisición de resistencia a no sólo se detectan subclonas tumorales resistentes tras la presión selectiva al recibir el tratamiento, sino que se detectan subclonas resistentes previas al inicio de tratamiento¹⁸⁹.

La biopsia líquida, entendiendo como tal la extracción de una muestra sanguínea o de otros fluidos, permite estudiar en tiempo real los cambios a nivel genético y epigenético que se producen durante la evolución de la enfermedad¹⁹⁰. Si bien, existe una alta concordancia entre el estado mutacional de *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* en el tejido, y el ADNtc de pacientes con CCR, es interesante mencionar que el análisis de ADNtc detecta mutaciones en *KRAS*, no detectadas en la pieza quirúrgica¹⁹¹. Por tanto, parece que en la biopsia líquida se podría detectar la heterogeneidad intratumoral clonal con mayor sensibilidad que en el tejido, ya que normalmente el tejido tumoral analizado procede de una pequeña zona particular del tumor, donde esta heterogeneidad puede no estar representada, en cambio sí lo puede estar en el ADNtc¹⁹².

Paralelamente, el ADNtc ha demostrado una particular utilidad en monitorizar la respuesta, e identificar mecanismos de resistencia al tratamiento en CCR avanzado. Se ha demostrado que la detección de ADNtc, permite detectar la heterogeneidad tumoral longitudinal bajo la presión del tratamiento con anticuerpos anti-EGFR¹⁹³. Además, el análisis longitudinal de ADNtc mostró que estas mutaciones emergen rápidamente durante el bloqueo del receptor EGFR, frecuentemente son de nuevo detectadas en plasma antes que la progresión tumoral sea visualizada por una prueba radiológica¹⁹⁴. En la era de la inmunoterapia, donde se ha podido relacionar una alta carga mutacional con respuesta al tratamiento, la biopsia líquida es una herramienta útil para detectar esta heterogeneidad intratumoral y la carga mutacional tumoral, relacionada con eficacia a

inmunoterapia¹⁹⁵⁻¹⁹⁶. Dentro de este apartado de la biopsia líquida, es de vital importancia la incorporación de la epigenética, como herramienta útil, no sólo a nivel diagnóstico, con la búsqueda de biomarcadores, sino también como pronóstica, y de aplicabilidad clínica, como la predictiva de respuesta. Este último punto referente a la respuesta terapéutica, me parece de gran interés en la práctica clínica, no sólo abordando los mecanismos de resistencia, a través de un análisis mutacional, sino también desde un análisis epigenético. Desde este análisis no sólo podremos descubrir vías nuevas de resistencia, sino descubrir nuevas dianas terapéuticas, que podrían mejorar la supervivencia de nuestros pacientes con CCR¹⁹⁷⁻¹⁹⁸.

6.3 *Discusión por Objetivos*

La epigenética, entendida en nuestro estudio como una herramienta reguladora de expresión genes y valorada mediante el estado de metilación del ADN, ha demostrado contribuir de forma activa al proceso de carcinogénesis del CCR, pero su influencia en la heterogeneidad intratumoral ha sido menos estudiada; si bien muchos de los genes supresores de tumores están inactivados por hipermetilación de los promotores de las islas CpG¹⁹⁹.

De forma lógica, en nuestro trabajo se observa que la heterogeneidad intertumoral es mayor que la existente en una misma masa tumoral, ya que se trata de diferencias existentes entre tumores de diferente origen, procedentes de diferentes individuos²⁰⁰. En este contexto, la heterogeneidad epigenética intertumoral ya permite discernir entre un grupo de pacientes con tumores de un mismo origen a nivel carcinogénico, como son los tumores con fenotipo MSI, y las mutaciones en BRAF.

Este fenómeno corresponde con otros trabajos previos, en los que se ha descrito que la presencia de MSI da lugar a fenotipos tumorales hipermetilados, debido a alteraciones en los sistemas de reparación del ADN, que tienen su origen de forma mayoritaria en la metilación temprana de genes de la vía MMR. Gracias al establecimiento de esta heterogeneidad intertumoral en el CCR, se han podido

establecer los diferentes subgrupos moleculares, clasificando así mejor a los pacientes¹³³⁻¹³⁴. Un contexto parecido, es el descrito en los casos de gliomas con metilación en el promotor del gen que codifica para MGMT, los cuales se han asociado con fenotipos hipermetiladores (CIMPg), dando lugar a una nueva clasificación de tumores menos agresivos, y con mejor pronóstico²⁰¹. A nivel epigenético, otros autores han descrito la heterogeneidad intertumoral anteriormente, ejemplos tenemos en cáncer de páncreas, pulmón y tumores cerebrales²⁰²⁻²⁰⁴, definiéndola como mayor que la intratumoral, y que es conducida mayoritariamente por modificaciones epigenéticas.

Centrándonos en el objetivo principal de esta tesis, destinado a estudiar la heterogeneidad intratumoral espacial, en los resultados presentados se observa la existencia de esta, aunque en un pequeño porcentaje de las posiciones CpG interrogadas. Era de esperar que estas diferencias fueran en pequeño porcentaje (9%) respecto a las posiciones CpG estudiadas, ya que se trata de células tumorales con un origen común, pertenecientes a la misma masa tumoral del mismo paciente. Este hecho se corrobora otros estudios publicados sobre la existencia de esta heterogeneidad intratumoral a nivel genético, y epigenético en otras neoplasias, donde la secuenciación multirregional en tumores como carcinoma renal, glioblastoma y cáncer de pulmón, han mostrado una divergencia significativa entre distintas áreas del mismo tumor pudiendo deducir²⁰⁵⁻²⁰⁸, a partir del estudio de diferentes regiones intratumorales, cuáles son las alteraciones moleculares que se producen de forma temprana en el proceso de carcinogénesis, así como las que aparecen de forma tardía, solamente en clones de células tumorales de algunas de las regiones estudiadas.

Respecto al estudio de la heterogeneidad intratumoral de las tres regiones intratumorales estudiadas de cada paciente, y de cuál era la sección más epigenéticamente divergente, fue el frente invasivo la observada en la mayoría de los casos. Esto podría estar en concordancia con que el frente invasivo, es una región crucial de cambios moleculares relacionados con cambios de expresión en moléculas de adhesión, así como cambios en proteínas en la zona de transición epitelio mesénquima, asociados con la invasión tumoral²⁰⁹⁻²¹⁰. En este sentido, se ha podido constatar en la bibliografía que la pérdida de la membrana basal en

tumores colorectales se considera un factor pronóstico de la evolución del tumor. Dicha membrana basal desaparece de forma selectiva en el frente invasivo de los tumores, siendo un factor independiente de crecimiento del tumor, y del proceso de metástasis. Esta pérdida de la membrana basal se confirma también selectivamente en el frente invasivo de las metástasis de muestras de pacientes con cáncer de colon, y está íntimamente relacionada con la zona de transición epitelio-mesénquima (EMT), que está implicado en procesos represores de la transcripción²¹¹.

No obstante, en un porcentaje de los casos, observamos que las regiones intratumorales epigenéticamente más divergentes, son la zona cercana al tracto digestivo y la zona tumoral central, sugiriendo que no siempre es el frente invasivo la zona con expresión de proteínas más diferencial, y que la heterogeneidad epigenética intratumoral no tiene por qué estar asociada solamente a fenómenos de invasión. Es importante remarcar que las posiciones CpG evaluadas correspondían solamente a las presentes en zonas promotoras de genes, eliminando la influencia de otros fenómenos epigenéticos que pueden ocurrir en otras zonas génicas, relacionadas con zonas no codificantes. El objetivo de esta selección, era el de determinar aquellos cambios epigenéticos asociados con la expresión génica, para darle un sentido biológico a la presencia de heterogeneidad intratumoral, asociado a la expresión diferencial de proteínas, como efectoras en las vías celulares.

Para poder evaluar el papel del nivel de heterogeneidad epigenética intratumoral como factor pronóstico en CCR, se generó un coeficiente basado en la desviación estándar de cada posición CpG de zonas promotoras entre las 3 subregiones tumorales, independientemente de cuál fuera la más divergente, usando la mediana como umbral categórico para realizar estudios de supervivencia. Este coeficiente fue calculado como coeficiente de homogeneidad, en lugar de heterogeneidad, con el criterio que las regiones intratumorales eran mayoritariamente homogéneas epigenéticamente, discerniendo solamente en un 9% de las posiciones CpG interrogadas. En este contexto terminológico, un alto coeficiente de homogeneidad epigenética, indicaba un nivel de heterogeneidad intratumoral bajo, siendo un tumor con alta clonalidad entre regiones, y viceversa. Este coeficiente, aplicado al análisis

pronóstico, mostró de forma significativa que, la presencia de mayor homogeneidad o clonalidad intratumoral, estaba correlacionada con una peor supervivencia libre de progresión, y supervivencia global.

Basándonos en la evidencia de la literatura publicada previamente, los resultados obtenidos en nuestro trabajo son contradictorios, teniendo que recalcar, que la mayoría de los estudios de heterogeneidad están basados en su papel bajo la presión de un tratamiento. En nuestro trabajo, las muestras analizadas no habían recibido tratamiento alguno, por lo que hipotetizamos que la clonalidad se podría relacionar con una mayor agresividad tumoral desde su inicio, sin necesidad de esperar a la presencia de otras alteraciones secundarias en el tiempo, que dirijan la supervivencia tumoral. Con estos datos, se podría postular que el comportamiento biológico del tumor viene predeterminado de forma temprana.

Por otro lado, el nivel de heterogeneidad intratumoral no se relacionó con ninguna de las variables clínicas, patológicas ni moleculares estudiadas, pudiendo deducir que su presencia no está enriquecida en ningún tipo de clasificación intertumoral (tumores mutados, tipo histológico) o interpaciente (edad, sexo).

Como objetivo secundario de la tesis, se analizó que región intratumoral del tumor primario, era epigenéticamente más similar a su metástasis pareada. El objetivo era determinar en qué región tumoral podían haberse generado las células, que posteriormente desarrollarían la metástasis, usando su nivel de clonalidad. En el presente estudio, la zona tumoral en contacto con el tracto digestivo (TS) fue mayoritariamente la más clonal entre el tumor primario y su metástasis. Siendo la TS, la zona más antigua del tumor, y pudiendo elucubrar, que el proceso de diseminación a distancia podría ocurrir de forma temprana dentro del modelo de carcinogénesis, por extravasación pasiva a los vasos sanguíneos cercanos que irrigan la zona.

El inferir si una metástasis tiende a aparecer de forma temprana o tardía en el proceso de invasión tumoral, es un punto que permanece en controversia, de la misma manera que si las metástasis provienen directamente de un tumor primario, o evolucionan de forma independiente como metástasis sin relación con el tumor

primario. En el modelo de progresión lineal, los precursores metastásicos abandonan el tumor primario en etapas tardías de la enfermedad, después que la evolución clonal haya dado lugar a una célula con capacidad metastásica y, en consecuencia, los tumores primarios y las metástasis están estrechamente relacionados a nivel molecular²¹².

Por otro lado, en el modelo de progresión paralela, se asume que la metástasis ocurre en las primeras etapas de la carcinogénesis, y que las metástasis y el tumor primario, evolucionan de forma independiente, lo que resulta en una diversidad molecular entre ellos. Según los resultados obtenidos en esta tesis, se podría hipotetizar que, en la mayoría de los casos, las metástasis se podrían estar formando de forma más temprana, procediendo de la zona más antigua del tumor, siguiendo un modelo más adecuado al de progresión paralela. No obstante, y tras el análisis de metilación individual de las 3 regiones intratumorales, el porcentaje mayor de divergencia entre regiones se objetiva en el frente invasivo, factor que puede hacer pensar que la propagación y diseminación, proviene de la propia infiltración celular del frente invasivo, estando más en consonancia con un modelo de progresión lineal. Respecto a los porcentajes de semejanza entre tumor primario y metástasis, los de la región central tumoral (CB) presentaron una similitud a los de la superficie próxima al tracto digestivo (TS), teniéndose en cuenta que las regiones proceden de muestras de tejido parafinado, donde la pérdida de conformación espacial del tumor no puede asegurar al 100% el origen de esta zona central, a diferencia de las otras dos zonas, en las que se tenía una referencia histológica de localización.

Respecto al análisis del momento de aparición de las metástasis, definidas como metástasis sincrónica y metacrónicas, no encontramos enriquecimiento de un porcentaje de semejanza con una región del tumor primario concreta, que nos permita discernir si siguen un modelo de progresión distinto. Hipotetizábamos que el tipo de origen de metástasis se relacionara con el momento de aparición de estas: las metacrónicas, serían las metástasis más clonales con el frente invasor, derivándose de un proceso lineal de invasión y migración celular desde el frente; las sincrónicas estarían relacionadas con la superficie más próxima al tracto digestivo por su evolución más afín al modelo de progresión paralela. No obstante,

no pudimos observar diferencias en este sentido. Adicionalmente, no pudimos tampoco observar correlación entre el tiempo de aparición de la metástasis, y las variables de la población del estudio (clínicas, histopatológicas o moleculares).

6.4 Fortalezas

1. La homogeneidad de la población del estudio, entendiendo como tal la elección de muestras parafinadas de pacientes operados de su tumor primario y/o metástasis hepáticas (sincrónicas o metacrónicas) que no habían recibido tratamiento previo a su análisis. Esta población es difícil de obtener actualmente, dado que estos pacientes reciben tratamiento sistémico previo a la valoración de la cirugía propia de las lesiones hepáticas o de su primario, y por lo tanto, se crea de entrada una heterogeneidad intratumoral inducida por la propia presión que ejerce el tratamiento recibido. En nuestra población podemos discernir la heterogeneidad producida por la propia evolución del tumor, tanto a nivel espacial como temporal, siendo las metástasis muestras también libres de tratamiento.

2. Se trata de una población seleccionada y muy bien caracterizada a nivel clínico, molecular e histológico. En la cohorte se ven representados los principales grupos clínicos (colon izquierdo vs derecho; enfermedad locoregional vs metastásica) y moleculares (fenotipo MSS vs MSI, mutaciones en KRAS y BRAF) propios de las cohortes de CCR de manera balanceada, pudiendo estudiar las asociaciones entre variables de forma óptima. Además, se ha realizado un estudio histológico exhaustivo, con información detallada de tipo de frente tumoral, nivel de “budding” tumoral, así como de inflamación y necrosis.

3. Hemos usado la epigenética para estudiar el nivel de heterogeneidad, usando metodología cuantitativa. Esto ha permitido establecer comparaciones tanto cualitativas, basadas en la generación de heatmaps y dicotomización de variables, como cuantitativas. El carácter cuantitativo de las variables ha permitido calcular un coeficiente de homogeneidad, que ha permitido asociar el nivel de esta con variables de supervivencia, pudiendo así estudiar su impacto en el pronóstico.

4. La epigenética en sí está relacionada con el origen tisular y la regulación génica para la diferenciación de estos. Por ese motivo, puede ser una herramienta más precisa que la genómica para intentar discernir el origen de las metástasis, usándola como método comparativo de estas con diferentes zonas del tumor primario.

6.5 Debilidades

1. La población de estudio, para estar balanceada a nivel de grupos clínicos, histológicos y moleculares, fue seleccionada y, por este motivo, presenta un sesgo importante, respecto a una población representativa de CCR. Por este motivo, los porcentajes obtenidos para las distintas variables poblacionales, así como los de supervivencia no son los esperados, obteniendo una población con una supervivencia mayor a la esperada por sus condiciones.

2. En referencia al estudio de supervivencia, y su relación con la heterogeneidad epigenética intratumoral mediante el coeficiente de homogeneidad epigenética, el número de pacientes a analizar fue menor al planteado inicialmente, llegando a ser de 50 pacientes, debido a que se tuvo que descartar la cohorte de de fenotipo MSI, porque tenía niveles de metilación superiores no normalizables, y suponía un sesgo tanto de selección, como de análisis de resultados, así como los casos con enfermedad avanzada, ya que habían sido la mayoría seleccionados con la condición de tener tejido de metástasis hepática disponible, y no habían recibido previo tratamiento, siendo una población sesgada.

3. Al trabajar con muestras de tejido incluido en parafina, se pierde la conformación tumoral en 3D, siendo más difícil definir qué zona del tumor se está seleccionando para el estudio de heterogeneidad intratumoral espacial. Aunque en el caso de la región de frente invasivo y región cercana al tracto digestivo se poseía de una referencia histológica, fue más difícil discernir qué región tumoral quedaba representada en la región central.

4. Aunque las regiones tumorales estudiadas fueron analizadas a nivel histológico, asegurando una infiltración inmunitaria, así como un nivel de estroma y nivel necrótico similar en las 3 zonas intratumorales, obteniendo un enriquecimiento de células tumorales de mínimo un 80%, al analizar toda la región, se puede asegurar que los niveles de heterogeneidad son debidos a las células tumorales de forma mayoritaria, pero no única.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo, según los objetivos establecidos son:

1. La heterogeneidad epigenética intratumoral en la población analizada es baja aunque existente, siendo la zona intratumoral epigenéticamente más divergente el frente invasor, tanto a nivel global, como por porcentaje de forma individual por paciente. No existe una asociación entre las diferentes variables clínico-patológicas y moleculares, y la región intratumoral más epigenéticamente divergente.
2. Mediante el análisis de la heterogeneidad intratumoral espacial, se pudo generar un coeficiente de homogeneidad epigenética, que mostró ser un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión y global en la población con enfermedad locoregional, con fenotipo MSS y sin mutaciones en BRAF. No existe una asociación entre las diferentes variables clínico-patológicas y moleculares, y el nivel de heterogeneidad intratumoral de acuerdo con el coeficiente.
3. El nivel de heterogeneidad epigenética intertumoral es mayor que la heterogeneidad epigenética intratumoral, confirmando que las diferencias interindividuo, son superiores a las que se puedan encontrar dentro de una misma masa tumoral. El grupo de casos con fenotipo MSI se agrupaban de forma independiente, mostrando un perfil hipermetilado diferencial al resto de pacientes.
4. En referencia a la heterogeneidad intratumoral temporal, la región del tumor primario más epigenéticamente semejante a la metástasis, fue en mayor frecuencia, la más próxima a la superficie del tracto digestivo, dando a pensar en un posible origen metastásico temprano, siguiendo un modelo de progresión paralela. No existe asociación entre el origen de las metástasis con las diferentes variables clínico-patológicas, moleculares, así como con el momento de aparición de las metástasis, ya sean sincrónicas o metacrónicas.

8. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

8. LÍNEA FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

En esta tesis se ha podido demostrar la utilidad del análisis de metilación del ADN para determinar el nivel de heterogeneidad intratumoral espacial, así como intertumoral. También nos ha permitido sugerir un posible origen metastásico a partir del estudio de la semejanza epigenética entre tumor, y su metástasis derivada. No obstante, la metodología utilizada en esta tesis, tanto a nivel tecnológico como la aproximación del análisis múltiple de diferentes zonas intratumorales, no resulta viable para la aplicabilidad clínica diaria.

Por esa razón, los siguientes pasos será trasladar nuestros resultados a aproximaciones más viables:

1. Se está analizando la ontología de los genes diferencialmente metilados entre las diferentes regiones intratumorales, para elucidar qué vías, y mecanismos celulares están implicadas. Después de demostrar la relación entre el nivel de expresión de ARNm, estudiar la expresión a nivel de proteína por inmunohistoquímica, tanto a nivel cuantitativo, como su distribución espacial en las diferentes regiones tumorales, para poder determinar su impacto a nivel pronóstico como una herramienta disponible en la práctica clínica.

En el contexto de la zona de origen de las metástasis, seleccionar un set de genes relacionados con la zona de mayor semejanza, tanto cuando es la zona cercana al tracto digestivo, como cuando es el frente invasivo. Analizar los genes más prometedores a nivel de expresión de proteína por IHC, tanto en las regiones intratumorales como en la metástasis, para validar los resultados observados en el estudio de metilación y darle sentido biológico.

2. Análisis epigenético en el ámbito de la biopsia líquida en el CCR, a partir del estudio de estos nuevos biomarcadores de forma prospectiva y longitudinal, a nivel pronóstico, y bajo la presión de un tratamiento oncológico, con la idea de encontrar biomarcadores de resistencia, para en un futuro poder diseñar estudios con nuevas dianas terapéuticas, que nos puedan aportar un beneficio para el paciente.

Además, la monitorización de los biomarcadores relacionados con el origen epigenético de las metástasis, nos permitirá evaluar la presencia de estos a lo largo de la evolución de la enfermedad, evaluando su presencia en ADNtc en relación con la progresión metastásica. La recogida prospectiva de sangre en diferentes puntos del tratamiento, hasta la recaída con enfermedad diseminada, nos permitirá estudiar retrospectivamente la presencia de estos biomarcadores y, según cuales estén presentes, sugerir un origen metastásico siguiendo un modelo de progresión lineal o paralela.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Feraly J, SiegelR, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021 june;71(3): 209-249.
2. Siegel R.L., Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019 Jan;69 (1):7-34, 2019.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020 Jan; 70 (1):7-30.
4. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, Jemal A, Kramer JL, Siegel RL. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019 Sep; 69(5):363-385.
5. Cifras del cáncer en España. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Sociedad Española de Oncología médica (SEOM) 2019.
6. Keum Nana, Giovannucci Edward. Global burden of colorectal cancer: Emerging trends, risks factors and prevention strategies. Nature Reviews Gastroenterology Hepatol. 2019 Dec; 16 (12): 713-732.
7. Condeduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). Int J. Oncol. 2013 Oct;43(4): 973-984.
8. Winawer S.J. et al. Colorectal cancer screening clinical guidelines and rationale. Gastroenterology. 1997 Feb;112(2): 594-642.
9. Lynch H.T, De la Chapelle J. Hereditary colorectal cancer. N. Engl J Med. 2003 Mar 6;348 (10):919-32.

10. Patel S.G., Ahnene D.J. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012 Oct; 14(5): 428-438.
12. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diag.* 2008 Jan;10(1):13-27.
13. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008 Oct ;135(4):1079-1099.
14. Pawlick TM, Raul CP, Rodríguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers.* 2004;20 (4-5):199-206.
15. Strum WB. Colorectal Adenomas. *N Engl J Med.* 2016 Mar 17;374(11):1065-1075. 2016.
16. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, Van Es JH, Clevers H, Lowe SW. APC restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. *Cell.* 2015 Jun 18;161(7):1539-1552.
17. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Res.* 2012 Jn; 5(1):19-27.
18. Legget B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6): 2088-2100.
19. Kedrin D, Gala MK. Genetics of the serrated pathway to colorectal cancer. *Clin Transl Gastroenterol.* 2015 Apr 9;6(4): e84.
20. Kim KM, Lee EJ, Ha S, Young Kang S, Kee-Taek, J, Park CK, Kim JY, Kim YH, Chang DK, Odze RD. Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas polyps from Korea. *Am J Surg Pathol.* 2011 Sep; 35(9):1274-1286.

21. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012 Jun;10(6): 639-645.
22. Istkovitz SH, Yio H. Inflammation and cancer. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. The role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol*. 2004 Jul;287(1): G7-G17.
23. Greene FL, Sobin LH. The TNM system: Our language for cancer care. *J Surg Oncol*. 2002 Jun; 80:119-120
24. NCCN Guidelines Version 4.2020 Colon Cancer (American Joint Committee on Cancer, TNM System for colon cancer 8th edition, 2017).
25. Van Eeghen EF, Bakker SD, Vna Bochove A, Loffeld RJLF. Impact of age and comorbidity on survival in colorectal cancer. *J Gastrointestinal Oncol*. 2015 Dec; 6: 605-612
26. Smith JJ, Tilney HS, Heriot AG, Darzi AW, Forbes H, Thompson MR, Stamatakis JD, Tekkis PP. Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. Social deprivation and outcomes in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2006 Sep;93(9): 1123-1131.
27. Amin MB, Edge SB, Greene F, Byrd DR, Rookland RK, Washington MK et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. American Joint Committee on Cancer: Chicago 2017 June.
28. Walter A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic, and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jul;9(7): 489-499.
29. Webber EM, Kauffman TL, O'Connor E, Goddard KA. Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy. *BMC Cancer*. 2015 Mar;21; 15:256.

30. Li M-X, Liu M-X, Zhang X-f, Zhang JF, Wang W-L, Zhu Y, Dong J, Cheng Ji-Wen, Zheng-Wen L, Ma, L, Lv Y. Prognostic role of neutrophil to lymphocyte ratio in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2014 May; 134(10): 2403-2413.
31. Galon J, Costes A, Sánchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagés F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep; 313(5895):1960-1964.
32. Cecil TD, Sexton R, Moran BJ, Heald RJ. Total mesorectal excision results in low local recurrence rates in lymph node-positive rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2004 Jul;47(7): 1145-9.
33. Basse L, Madsen JL, Billesbølle P, Bardram L, Kehlet H. Gastrointestinal transit after laparoscopic vs open colonic resection. *Surg Endosc*. 2003 Dec;17(12):1919-22.
34. West NP, Hohenberger W, Weber K, Perrakis A, Finan PJ, Quirke P. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10; 28(2): 272-78.
35. Trastulli S, Cirocchi R, Listorti C, Cavaliere D, Avenia N, Gulla N, Giustozzi G, Sciannameo F, Noya G, Boselli C. Laparoscopic vs open resection for rectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Colorectal Dis*. 2012 Jun;14 (6): e277-96.
36. Gunderson LL, Haddock MG, Schild SE. Rectal cancer: preoperative versus postoperative irradiation as a component of adjuvant treatment. *Semin Rad Oncol*. 2003 Oct;13(4): 419-32.

37. Kapiteijn E, Marijnen CAM, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlam L, Glimelius B, Van Krieken JH, Leer JW, Van de Velde J, Dutch Colorectal Cancer Group. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 2001 Aug;345 (9): 638-46.
38. Sauer R, Becker H, Hohenberger WR, Rodel C, Wittrkind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelistch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R, German Rectal Cancer Study Group. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 21; 351(17): 1731-40.
39. Bahadoer RR, Dijkstra EA, Van Etten B, Marijnen CAM, Putter H, Meershoek-Klein Kranenburg E, Roodvoets AGH, Nagtegaal ID, Beets-Tan RGH, Blomqvist LK, Fokstuen T, Ten Tije AJ, Capdevila J, Hendriks MP, Edhemovic I, Cervantes A, Nilsson PJ, Glimelius B, Van de Velde CJH, Hospers Geke AP. Rapido collaborative investigators. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021 Jan;22(1): 29-42.
40. Conroy T, Lamfichekh N, Ettine PL, Rio E, Francois E, Mesgouez-Nebout N, Vendrely V, Artignan X, Bouche O, Gargot D et al. Total Neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer. Final results of PRODIGE23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. *J Clin Oncol*. 2020 June; 38, Abstr 4007.
41. García-Aguilar J, Patil S, Kim JK, Yuval JB, Thompson H, Verheij F, Lee M, Saltz LB. Preliminary results of the organ preservation of rectal adenocarcinoma (OPRA) trial. *J Clin Oncol*. 2020 June; 38, Abstr 4008.
42. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 15; 22(2): 229-37.

43. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crino L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto, Porcile G, Fioretto L, Oraldini C, Andreaucetti M, Masi G, Gruppo Oncologico Nord Ovest. 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 Nord Ovest. *J Clin Oncol*. 2007 May 1; 25(13): 1670-76.

44. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Carteni G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Loruso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Vita Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carozza F, Nettis G, Valdesi M, Filipelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti C, Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. Phase III randomized trial of FOLFIRI vs FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal Cancer: A multicenter study of the Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1; 23 (22):4866-75.

45. Bokemeyer C, Bodarenko I, Hartmann JT, De Braud F, Schuch G, Zubel A, Celik I, Schlichting M, Koralewski P. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol*. 2011 Jul; 22(7): 15535-46.

46. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barrugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocanova I, Ruff P, Blasinska-Morawiec M, Smakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wizek J, Sidhu R, Pattersson SD. Panitumumab-FOLFOX-4 treatment, and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013; 369 (11): 1023-34.

47. Tabernero J, Van Cutsem E, Lackomy R, Prausova J, Ruff P, Van Hazel GA, Moiseyenko VM, Ferry DR, McKendrick JJ, Sousan-Lazard K, Chevalier S, Allegra CJ. Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and

irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: Prespecified subgroup analyses from The VELOUR trial. *Eur J Cancer*. Jan 2014; 50 (2): 320-31.

48. Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: Analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2009 Jan;14 (1): 22-28.

49. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, Scharag D, Greene C, O'Neil BH, Atkins JN, Berry S, Polite BN, O'Reilly EM, Goldberg RM, Hochster HS, Schilsky RL, Bertagnolli MM, El-Khoueiry AB, Watson P, Benson AB 3rd, Mullerin DL, Mayer RJ, Blanke C. 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. *J Am Med Assoc, JAMA*. 2017 20;317 (23): 2392-401.

50. Lehnert T, Menther M, Pollok A, Schaible A, Hinz U and Herfarth C. Multivisceral resection for locally advanced primary colon and rectal cancer: an analysis of prognostic factors in 201 patients. *Ann Surg*. 2002 Feb; 235 (2): 217-225.

51. Croner RS, Merckel S, Papadopoulos T, Schellerer V, Hohenberger W and Goehl J. Multivisceral resection for colon carcinoma. *Dis Colon rectum*. 2009 Aug; 52 (8): 1381-1386.

52. Foxtrot Collaborative Group. Feasibility of preoperative chemotherapy for locally advanced, operable colon cancer. The pilot phase of a randomized controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012 Nov;13 (11):1152-1160.

53. Jacobsen A, Andersen F, Fischer A, Jensen LH, Jorgensen JCR, Larsen O, Lindebjerg J, Ploen J, Rafaelsen SR, Vilandt J. Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced colon cancer. A phase II trial. *Acta Oncol*. 2015 Nov; 54 (10):1747-53.

54. Dehal A, Graff-Baker AN, Vuong B, Fisher T, Klemper SJ, Cing Chang S, Grunkemeier GL, Bilchik AJ, Goldfarb M. Neoadjuvant chemotherapy improves Survival in patients with clinical T4b Colon Cancer. *J Gastrointest Surg.* 2018 Feb; 22(2): 242-249.
55. Heald RJ, Ryall, RDH. Recurrence and Survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet.* 1986 Jun 28;1(8496): 1479-82.
56. Cedermark B, Dahlberg M, Glimelius B, Pahlman L, Rutquist LE, Wilking N. Improved Survival with Preoperative Radiotherapy in resectable Rectal Cancer. Swedish Rectal cancer Trial. *N Engl J Med.* 1997 Apr 3;336(14):980-7.
57. Bosset JF, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Briffaux A, Collette L. Enhanced tumoricidal effect of chemotherapy with preoperative Radiotherapy for Rectal cancer: Preliminary results- EORTC22921. *J Clin Oncol.* 2005 Aug 20;23(24): 5620-5627.
58. MERCURY Study Group. Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer. Prospective observational study. *BMJ.* 2006 Oct 14;333(7572): 779.
59. Rodel C, Graeven U, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Arnold D, Hofheinz RD, Ghadimi M, Wolf HA, Lang-Welzenbach M, Raab HR, Wittekind C, Strobel P, Staib L, Wilhelm M, Grabenbauer GG, Hoffmanns H, Lindemann F, Schlenska-Lange A, Folprecht G, Sauer R, Liersch T, German Rectal Cancer Study Group. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 Study): Final results of the multicentre, open-label, randomized trial, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015 Aug;16(8): 979-989
60. O'Connell MJ, Colangelo LH, Beart RW, Petrelli NJ, Allegra CJ, Sharif S, Pitot HC, Shields AF, Landry JC, Ryan DP, Parda DS, Mohiuddin M, Arora A, Evans LS, Bahary N, Soori GS, Eakle J, Robertson JM, Moore Jr DF, Mullane MR,

Marchello BT, Ward PJ, Wozniak TF, Roh MS, Yothers G, Wolmark N. Capecitabine and Oxaliplatin in the Preoperative Multimodality Treatment of Rectal Cancer: Surgical End Points From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Trial R-04. *J Clin Oncol*. 2014 Jun 20;32(18): 1297-1934.

61. Van der Valk MJM, Hilling DE, Bastiaannet E, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Beets GL, Figueredo NL, Habr-Gama A, Pérez RO, Renehan AG, Van de Velde CJH, IWWD Consortium. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch and wait Database: An international multicentre registry study. *Lancet*. 2018 Jun 23;391(10139):2537-2545.

62. Moertel CG, Fleming TR, Mac Donald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, Veeder MH, Mailliard JA. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: A final report. *Ann Intern Med*. 1995 Mar 1;122(5):321-6.

63. Carrato A, Kohne C, Bedenne L, Popov I, Bouche, Gaspar E. Folinic acid modulated bolus 5-FU or infusional 5-FU for adjuvant treatment of patients of UICC stage III colon cancer: Preliminary analysis of the PETACC-2 study. *J Clin Oncol*. June 2006; 24 (Suppl 18), Abstr 3563.

64. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, De Gramont A. Oxaliplatin, Fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3; 350 (23): 2343-51.

65. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, Petrelli NJ, Findlay MP, Seay TE, Atkins JN, Zapas JL, Goodwin JW, Fehrenbacher L, Ramanathan RK, Conley BA, Flynn PJ, Soori G, Colman LK, Levine EA, Lanier KS, Wolmark N. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: Results from NSABP C-07. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 1; 25(16): 2198-204.

66. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, Fields LA, Mayer RJ. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: Results of CALGB 89803. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 10;25 (23): 3456-61.
67. Twelves C, Wong A, Novacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, Cassidy J, Cervantes A, Fagerberg J, Georgoulas V, Hussein F, Jodrell D, Koralewski P, Kroning H, Maroun J, Marcschner N, McKendrick J, Pawlicki M, Rosso R, Schuller J, Seitz JF, Stabuc B, Tujakowski J, Van Hazel G, Zaluski J, Scheithauer W. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005 June 30;352(26):2696-704.
68. Haller DG, Cassidy J, Tabernero J, Maroun JA, De Braud FG, Price TJ. Efficacy findings from a randomized phase III trial of capecitabine plus oxaliplatin versus bolus 5-FU/LV for stage III colon cancer (NO16968): Impact of age on disease-free survival (DFS). *J Clin Oncol*. 2010 May;28 (15-Suppl): 3521.
69. De Gramont A, Van Cutsem E, Tabernero J, Moore MJ, Cunningham D, Rivera F et al. AVANT: Results from a randomized, three-arm multinational phase III study to investigate bevacizumab with either XELOX or FOLFOX4 versus FOLFOX4 alone as adjuvant treatment for colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Feb;29 (4-Suppl):362.
70. Taieb J, Tabernero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem JL, Thaler J, Bridgewater J, Peteresen LN, Blons H, Collette L, Van Cutsem E, Rougier P, Salazar R, Bedene L, Emile JF, Laurent-Puig P, Lepage C. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): An open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jul;15(8):862-73.
71. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Graeme J Poston, Schalg PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Mauer M, Tanis E, Van Cutsem E, Scheitauer W, Gruenberger T, EORTC Gastro-Intestinal Tract Cancer Group; Cancer Research UK. et al. Perioperative

FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC40983): Long-term results of a randomized, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013 Nov; 14 (12): 1208-15.

72. Mitry E, Fields LA, Bleiberg H, Labianca R, Portier G, Tu D, Nitti D, Torri V, Elias D, O'Callaghan C, Langer B, Martignoni G, Bouche O, Lazorthes F, Van Cutsem E, Bedenne L, Moore MJ, Rougier P. Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *J Clin Oncol.* 2008 Oct 20;26 (30): 4906-11.

73. Leonard GD, Brenner B, Kemeny NE. Neoadjuvant chemotherapy before liver resection for patients with unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005 Mar 20;23(9): 2038-48.

74. Abad A, Figueras J, Valls C, Carrato A, Pardo F, Díaz-Rubio E, Aranda E. Guidelines for the detection and treatment of liver metastases of colorectal cancer. *Clin Transl Oncol.* 2007 Nov; 9 (11): 723-30.

75. Folprecht G, Gruemberger T, Bechstein WO, Raab HR, Lordick F, Hartmann JT, Lang JT, Frilling A, Stoehlmacher J, Weitz J, Konopke R, Stroszczyński C, Liersch T, Ockert D, Herrmann T, Goekkurt E, Parisi F, Kohne CH. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: The CELIM randomized phase 2 TRIAL. *Lancet Oncol.* 2010 Jan;11(1): 38-47.

76. Garufi C, Torsello A, Tumolo S, Ettore GM, Zeuli M, Campanella C, Vennarecci G, Mottolese M, Sperduti I, Cognetti F. Cetuximab plus chronomodulated irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin as neoadjuvant chemotherapy in colorectal liver metastases. POCHER trial. *Br J Cancer.* 2010 Nov 9;103(10): 1542-7.

77. Carrato A, Abad A, Massuti B, Grávalos C, Escudero P, Longo-Muñoz F, Manzano JL, Gómez A, Safont MJ, Gallego J, García-Paredes B, Pericay C, Dueñas R, Rivera F, Losa F, Valladares-Ayerbes M, González E, Aranda E. First-

line panitumumab plus FOLFOX4 or FOLFIRI in colorectal cancer with multiple or unresectable liver metastases: A randomized, phase II trial (PLANET-TTD). *Eur J Cancer*. 2017 Aug; 81:191-202.

78. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chien CRC, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Apr 2 ;360 (14):1408-17.

79. Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes RL, Barugel ME, Humblet Y. Randomized phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFOX4 compared with FOLFOX4 alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer (mCRC): Results by Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS). *J Clin Oncol*. 2011 May ;29 (15 Suppl) 3567-78.

80. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for metastatic colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun ;350 (23):2335-42.

81. Ragnhammar P, Hafstrom L, Nygren P, Glimelius B. A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2001 May; 40(2-3): 282-308.

82. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005 Feb 3; 352: 476-87.

83. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomized trial. *Lancet*. 2000 Mar 25; 355(9209): 1041-47.

84. De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000 Aug;18(16): 2938-47.
85. Tournigand C, Andre T, Achille E, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, De Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 15; 22(2): 229-37.
86. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Carteni G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarosa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carrozza F, Nettis G, Valdesi M, Filipelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti, Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22): 4866-75.
87. Ducreaux M, Bennouna J, Hebbar M, Ychou M, Lledo G, Conroy T, Adenis A, Faroux R, Rebischung C, Bergougnoux L, Kockler L, Douillard JY, GI Group of the French Anti-Cancer Centers. Capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus 5-fluorouracil_Leucovorin plus oxaliplatin (FOLFOX-6) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2011 Feb 1;128 (3): 682-90.
88. Diaz-Rubio E, Tabernero J, Gómez-España A, Massuti B, Sastre J, Chaves M, Abad A, Carrato A, Queralt B, Reina JJ, Maurel J, González-Flores E, Aparicio J, Losa F, Aranda E. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: Final report of the Spanish Cooperative Group for the treatment of digestive tumors. *J Clin Oncol*. 2007 Sep 20; 25(27): 4224-30.

89. Porschen R, Arknau HT, Kubicka S, Greil R, Seufferlein T, Freier W, Kretzschmar A, Graeven U, Grothey A, Hinke A, Schmiegel W, Schmoll HJ. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and Leucovorin plus oxaliplatin in metastatic Colorectal Cancer: A final. Report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol*. 2007 Sep 20; 25 (27): 4217-23.
90. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheitauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F, Saltz L. Randomized Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 20; 26(12): 2006-12.
91. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crino L, Benedetti G, Evangelista W, Franchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini C, Andreuccetti M, Masi G. 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. *J Clin Oncol*. 2007 May 1; 25(13): 1670-1676.
92. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurvitz HI, Bergsland E, Sarkar S. Combined Analysis of efficacy: The addition of Bevacizumab to Fluorouracil/Leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Jun 1;23(16): 3706-12.
93. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocvirk J, Shin DB, Jonker D, Osborne S, Andre N, Waterkamp D, Saunders MP. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): An open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013 Oct;14 (11): 1077-85.
94. Hurvitz HI, Fehrenbacher L, Hainswoth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, Hambleton J, Novotny WF, Kabbinavar F. Bevacizumab in combination with

Fluorouracil and Leucovorin. An active Regimen for first-line Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2005 May 20; 23(15): 3502-08.

95. Hurvitz HI, Yi, J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical Benefit of Bevacizumab in Metastatic Colorectal is independent of K-ras mutation status: Analysis of a Phase III Study of Bevacizumab with Chemotherapy in previously untreated Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2009 Jan; 14(1): 22-28.

96. Sobrero A, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, Vega-Villegas E, Eng C, Steinhauer E, Prausova J, Lenz HJ, Borg C, Middleton G, Kroning H Luppi G, Kisker O, Zubel A, Langer C, Kospit J, Burris 3rd HA. EPIC: Phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 May;26(14): 2311-19.

97. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, Mezi S, Tomasello G, Ronzoni M, Zaniboni A, Tonini G, Carlomagno C, Allegrini G, Chiara S, D'Amico M, Granetto C, Cazzaniga M, Boni L, Fontanini G, Falcone A. 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 III TRIBE study. *Lancet Oncol*. 2015 Oct; 16(13): 1306-15.

98. Saltz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F, Cassidy J. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008 Apr; 26(12): 2013-19.

99. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, Idziaszczyk S, Harris R, Fisher D, Kenny SL, Kay E, Mitchell JK, Madi A, Jasani B, James MD, Bridgewater J, Kennedy, Claes B, Lambrechts D, Kaplan R, Cheadle JP, MRC COIN Trial Investigators. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of

the randomized phase III MRC COIN trial. *Lancet*. 2011 Jun 18;377(9783): 2103-14.

100. Bokemeyer C, Bodarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, De Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zobel A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first line of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 10;27(5): 663-71.

101. Van Cutsem E, Lenz HJ, Khone CH, Heinemann V, Tepjar S, Melezinek I, Beier F, Stroh C, Rougier P, Van Krieken JH, Ciardello F. Fluorouracil, leucovorin and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Mar;33(7): 692-700.

102. Bokemeyer C, Bodarenko I, Hartmann JT, De Braud F, Schuch G, Zobel J, Celik I. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The OPUS study. *Ann Oncol*. 2011 Jul ;22(7):1535-46.

103. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Ruff P, Smakal M, Rother M, Williams R, Patterson SD. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013 Sep;369(11): 1023-34.

104. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJM, Schrama JG, Erdkamp FLG, Vos AH, Van Greningen CJ, Sinnige HAM, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Borger ME, Antonini NF, Mol L, Van Krieken JHJ, Dalesio O, Punt CJA. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Feb; 360(6): 563-72.

105. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, Marchall J, Cohn A, Mc Collum D, Stella P, Deeter R, Shahin S, Amado RG. A Randomized Phase IIIB trial of chemotherapy, Bevacizumab and Panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Feb ;27(5): 672-80.

106. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Inocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, Schrag D, Greene C, O'Neill BHM, Atkins JN, Berry S, Polite BN, O'Reilly EM, Goldberg RM, Hochster HS, Schilsky RL, Bertagnolli MM, El-Khoueriry, Watson P, Benson 3rd A, Mulkerin DL, Mayer RJ, Blanke C. Effect of first-line chemotherapy combined with cetuximab or bevacizumab on overall survival in patients with KRAS wild type advanced or metastatic colorectal cancer: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2017 Jun;317(23): 2392-401.

107. Heinemann V, Von Weikerthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S.E, Heintges T, Lerchenmuller C, Kahl C, Seipelt G, Kullmann F, Stauch M, Scheithauer W, Hielscher J, Scholz M, Muller S, Link H, Niederle N, Rost A, Hoffkes HG, Moehler M, Linding RU, Modest DP, Rossius L, Kirchner T, Jung. A, Stintzing S. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Sep;15(10): 1065-75.

108. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, Yu H, Oliner KS, Go WY. 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. *J Clin Oncol*. 2014 Jul 20; 32(21): 2240-47.

109. Porschen R, Arkenau HT, Kubicka S, Greil R, Seufferlein T, Freier W, Graeven U, Grothey A, Hinke A, Schmiegel W, Schmoll HJ. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer. A final report of the AIO colorectal study group. *J Clin Oncol*. 2007 Sep ;25(27): 4217-23.

110. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson 3rd AB. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, Fluorouracil and Leucovorin (FOLFOX-4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007 Apr; 25(12): 1539-44.

111. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Osterlund P, Greil R, Van Cutsem E, Von Moos R, Vieitez JM, Bouche O, Borg C, Steffenes CC, Alonso-Orduña V, Schichting C, Reyes-Rivera I, Bendahamane B, Andre T, Kubicka S. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147). A randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013 Jan;14(1): 29-37.

112. Kubicka S, Greil R, Andre T, Benounna J, Sastre J, Van Cutsem E, Von Moos R, Osterlund P, Rivera I, Muller T, Makrutizki M, Arnold D. Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings. *Ann Oncol.* 2013 Sep ;24(9): 2342-49.

113. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jul; 351: 337-345.

114. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Parusova J, Macarulla T, Ruff P, Van Hazel GA, Moiseyenko V, Ferry D, McKendrick J, Polikoff J, Tellier A, Castan R, Allegra C. 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. *J Clin Oncol.* 2012 Oct;30(28): 3499-506.

115. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, Nordlinger B, Van deVelde C, Balmaña J, Regula J, Nagtegaal ID, Arnold D, Ciardello F, Hoff P, Kerr D, Kohne CH, Labianca R, Price T, Scheithauer W, Sobrero A, Tabernero J, Aderka D, Barroso S, Bodoky G, Douillard JY, Gallardo J, Garin A, Glynne-Jones R, Jordan K, Papamichail D, Pfeiffer P, Souglakos I, Turhal S, Cervantes A. ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012 Oct; 23(10): 2479-516.

116. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes JR, Tebbutt NC, Van Hazel G, Wirzbicki R, Langer C, Moore MJ. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2007 Nov; 357(20): 2040-48.

117. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, Hanson JE, O'Callaghan CJ, Marginean C, Zalcborg JR, Simes J, Moore MJ, Tebbutt NC, Price TJ, Shapiro JD, Paulakis N, Gibbs P, Van Hazel GA, Lee U, Haq R, Virk S, Tu D, Lorimer AJ. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb; 20 (3): 744-53.

118. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado R. Open-label phase III Trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007 May ;25 (13): 1658-64.

119. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutse E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr ;26 (10): 1626-34.

120. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouche O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Tabernero J, Yoshino T, Lenz HJ, Goldeber RM, Sargent DJ, Cihon F, Cupit L, Wagner A, Laurent D. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicenter, randomized, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet*. 2013 Jan ;382 (9863): 303-12.

121. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone E, Yoshino T, García-Carbonero R, Mizunuma N, Yamazaki K, Shimada Y, Tabernero J, Komatsu Y, Sobrero A, Boucher E, Peeters M, Tran B, Lenz HJ, Zaniboni A, Hochster H, Cleary JM, Prener H, Benedetti F, Mizuguchi H, Makris L, Ito M, Ohtsu A. Randomized trial of TAS-102

for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2015 May ;372(20): 1909-19.

122. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, Wasan H, Ciardello F, Loupakis F, Hong YS, Guren TK, Arkeanu HT, Garcia-Alfonso P, Pfeiffer P, Orlov S, Lonardi S, Elez E, Kim TW, Schellens JAM, Guo C, Krishnan A, Dekervel J, Morris V, Calvo-Ferrandiz A, Braun M, Gollerkeri A, Keir C, Mharry K, Pickard M, Christy-Bittel J, Anderson L, Sandor V, Tabernero J. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E mutated colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2019 Oct 24; 381(17): 1632-1643.

123. Andre T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, Smith D, García-Carbonero R, Benavides M, Gibbs P, Rivera F, Elez E, Bendell J, Le DT, Yoshino T, Van Cutsem E, Yang P, Farooqui MZH, Marinello P, Diaz LA. Pembrolizumab in microsatellite instability-High advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2020 Dec 3;383 (23): 2207-2218.

124. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Mar 20; 5(1): 22

125. Dionna Green J, Sun Haiaho, Burnham J, Liu XI, Van den Anker J, Temeck J, Yao L, Mac Kune SK, Buckart GJ. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Mar; 69(3): 85-89.

126. Mayer B, Heinzl A, Lukas A, Perco P. Predictive biomarkers for linking pathology and drug effect, *Curr Pharm Des.* 2017; 23(1): 29-54.

127. Ruiz-Bañobre J, Kandimalla R, Goel A. Predictive Biomarkers in metastatic colorectal cancer. A systematic Review. *JCO Precis Oncol* 2019 Mar 28; 1-17.

128. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer.* 2008 May; 44(7): 946-53.

129. Plijus MV, Zhang Z, Chuong CM. Pub Focus: semantic MEDLINE/Pubmed citations analytics through integration of controlled biomedical dictionaries and ranking algorithm. *BMC Bioinformatics*. 2006 Oct 2; 7: 424-36.
130. Wang Q, Chaerkady R, Wu J, Hwang HJ, Papadopoulos N, Kopelovich L, Maitra A, Matthaei H, Eshleman JR, Hruban RH, Kinzler KW, Pandey A, Vogelstein B. Mutants proteins as cancer-specific biomarkers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Feb 8;108 (6): 2444-9.
131. Dhawan D, Padh H. Pharmacogenomics: technologies to detect copy number variations. *Curr Opin Mol Ther*. 2009 Dec; 11(6): 670-80.
132. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407): 330-337.
133. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, Reynes A, Schlicler A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sosusa Melo F, Missiaglia E, Barras D, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Med*. 2015 Oct; 21(11): 1350-56.
134. Roseweir AK, Mc Millan DC, Horgan PG, Edwards J. Colorectal cancer subtypes: Translation to routine clinical pathology. *Cancer Treatment Reviews*. 2017 Jun; 57: 1-7.
135. Włodarczyk M, Włodarczyk J, Siwinski P, Sobolewska A, Fichna J. Genetic molecular subtypes in optimizing personalized therapy for metastatic Colorectal cancer. *Current Drugs Targets*. 2018; 19 (15): 1731-1737.
136. Betch E, Reynes A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, Selves J, Sautes-Fridman C, Laurent-Puig P, Herman Fridman W. Immune and stromal classification

of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin Cancer Res* Mar. 2016 Aug 15; 22 (16): 4057-66.

137. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C, Hellmich MR, Chao C. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer and their clinical implications. *Int Biol Biomed J*. 2017; 3 (3): 105-111.

138. Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García- Albéniz X, Maurel J, Feliu Batlle J. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Jan; 109: 9-19.

139. Dienstmann R, Vermeulen L, Guiney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature Rev Cancer*. 2017 Feb; 17 (2): 79-92.

140. Graham DM, Coyle VM, Kennedy RD, Wilson RH. Molecular subtypes. And personalized therapy in metastatic colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2016; 12: 141-150.

141. Martini G, Dienstmann R, Ros J, Baraibar I, Cuadra-Arteaga JL, Salva F, Ciardello D, Mulet N, Argiles G, Tabernero J. Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2020 Jul 24; 12: 1-18.

142. Sveen A, Bruun J, Eide PW, Eilertsen IA, Ramirez L, Murumagi A, Arjama M, Danielsen SA, Kryeziu K, Elez E, Tabernero J, Guinney J, Palmer HG, Nesbakken A, Kallioniemi O, Dientsmann R, Lothe RA. Colorectal cancer consensus molecular subtypes translated to preclinical models uncover potentially targetable cancer cell dependencies. *Clin Cancer Res*. 2018 Feb 15;24 (4): 794-208.

143. Merlanom MC, Granetto C, Fea E, Ricci V, Garrone O. Heterogeneity of colon cancer: from bench to bedside. *ESMO Open*. 2017 Aug 22; 2 (3): e 000218.

144. Joung JG, Young Oh B, Kyung Hong H, Al-Khalidi H, Al-Alem F, Lee HO, Seol Bae J, Kim J, Cha HU, Alotaibi M, Beom Cho Y, Hassanain M, Park WY, Lee WY. Tumor heterogeneity predicts metastatic potential in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2017 Dec 1; 23 (23): 7209-16.
145. Vignot S, Lefebvre C, Frampton GM, Meurice G, Yelenski R, Palmer G et al. Comparative analysis of primary tumor and matched metastases in colorectal cancer patients: Evaluation of concordance between genomic and transcriptional profiles. *Eur J Cancer.* 2015 May; 51 (7): 791-99.
146. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevensson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla A, Vartanov A, Ferandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. Evolution and impact subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell.* 2013 Feb 14; 152 (4): 714-26.
147. Zhang J, Fujimoto J, Wedge DC, Song X, Seth S, Chow CW, Cao Y, Gumbs C, Gold KA, Kalhor N, Little L, Mahadeshwar H, Moran C, Protopopov A, Sun H, Tang J, Wu X, Ye Y, William WN, Lee JJ, Heymach JV, Hong WK, Swisher S, Wistuba I, Futreal PA. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinoma delineated by multiregional sequencing. *Science.* 2014 Oct; 346 (6206): 256-59.
148. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke M. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Jun; 104 (24): 1058-63.
149. Yap TA, Gerlinger M, Futreal PA, Pusztai L, Swanton C. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med.* 2012 Mar; 4 (127): 1021-31.
150. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Doanahue CA.

Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010 Oct 28; 467 (7319): 1114-17.

151. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8; 366 (10): 883-92.

152. Kim TM, Jung SH, An CH, Lee SH, Back IP, Kim MS, Park SW, Rhee JK, Lee SH, Chung YJ. Subclonal genomic architectures of primary and metastatic colorectal cancer based on intratumoral genetic heterogeneity. *Clin Cancer Res*. 2015 Oct 1; 21 (19): 4461-72.

153. Sottoriva A, Kang H, Ma Z, Graham TA, Salomon MP, Zhao J, Marjoram P, Siegmund K, Press MF, Shibata D, Curtis C. A big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet*. 2015 Mar; 47 (3): 209-16.

154. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblon T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Markovitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. The genomic landscape of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007 Nov 16; 318 (5853): 1108-13.

155. Yamamoto S, Midorikawa Y, Morikawa T, Nishimura Y, Sakamoto H, Ishikawa S, Akagi K, Aburatani H. Identification of chromosomal aberrations of metastatic potential in colorectal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010 May; 49 (5): 487-96.

156. Vermaat JS, Nijman IJ, Koudisjs MJ, Gerritse FL, Scherer SJ, Mokry M, Roessingh WM, Lansu N, Brujn E, Hillergersberg R, Van Diest P, Cuppen E, Voest EE. Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are

genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res.* 2012 Feb 1; 18 (3): 688-99.

157. Sveen A, Loes IM, Alagaratnam S, Nilsen G, Holand M, Lingjaerde OC, Sorbye H, Berg KCG, Horn A, Angelsen JH, Knappskog S, Lonning PE, Lothe RA. et al. Intra-patient inter-metastatic genetic heterogeneity in colorectal cancer as a key determinant of survival after curative liver resection. *PLOS Genet.* 2016 Jul 29; 12 (7): 1062-73.

158. 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 May 6; 90 (9): 675-84.

159. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Biancho A, Siena S, Bardelli A. Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discov.* 2014 Nov; 4 (11): 1269-80.

160. Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, Kotsopoulos SK, Nizard P, Perez-Toralla K, Rowell R, Olson J, Srinivasan P, Le Corre D, Hor T, Harrak Z, Li X, Link DR, Bouche O, Emile JF, Land B, Boige V, Hutchinsn JB, Taly V. Clinical relevance of Kras-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res.* 2015 Mar 1; 21 (5): 1087-97.

161. D'Arrigo A, Belluco C, Ambrosi A, Digito M, Espocito G, Bertola A, Fabris M, Nofrate V, Mammano E, Leon A, Nitti D, Lise M. Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 2005 Jun 10; 115 (2): 256-62.

162. Lee JR, Kwon CH, Choi Y, Park HJ, Kim HS, Jo HJ, Oh N, Park DY. Transcriptoma nalysis of paired primary colorectal carcinoma and liver metastases reveals fusion transcripts and similar gene expression profiles in primary carcinoma and liver metastases. *BMC Cancer.* 2016 Jul 26;16: 539-47.

163. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone H, Giordano S, Comoglio PM, Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*. 2003 Apr; 3 (4): 347-361.
164. Goel A, Boland CR. Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2012 Dec; 143 (6):1442-1460.
165. Gardiner Gardenn M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987 Jul 20; 196 (2): 261-282.
166. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. *Gastroenterology*. 2015 Oct; 149 (5): 1204-25.
167. Ng J, Yu J. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer *Int J Mol Sci*. 2015 Aug; 16: 2472-96.
168. Luo J, LI YN, Wang F, Zhang WM, Geng X. S-adenosylmethionine inhibits growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer. *Int J Biol Sci*. 2010 Dec 6; 6 (7): 784-95.
169. Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications-miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jul; 10 (7): 457-469.
170. Huang T. Targeting histone methylation for colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol*. 2017 Jun; 10 (1): 114-31.
171. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011 Nov 18; 12 (12): 861-874.
172. Song L, Jia J, Peng X, XiaoW, Li Y. The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screenings tests: a meta-analysis. *Sci Rep*, 2017; 7: 1-12.

173. Giardello FM. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2014; 147: 502-526.
174. Li M. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol.* 2009 Jun; 27: 858-853
175. Liang JT. Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 1999; 57: 149-56.
176. Amatu A. Promoter CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme MGMT predicts clinical response to dacarbazine in a phase II study for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2265-2272.
177. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. *Gastroenterology* 2015; 149: 1204-1225.
178. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer, the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Mar; 7 (3): 153-62.
179. Moutinho C, Martínez-Cardús A, Santos C, Navarro-Pérez V, Martínez-Balibrea E, Musulem E, Carmona J, Sartore-Bianchi A, Siena S, Elez E, Tabernero J, Salzar R, Abad A, Esteller M. Epigenetic inactivation of the BRCA1 intersector SRBC and resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *J Natl Cancr Inst.* 2014 Oct; 106 (1): 1-9.
180. Moran S, Martínez-Cardús A, Sayos IS, Musulen E, Balaña C, Estival Gonzalez A, Moutinho C, Heyn H, Diaz-Lagares A, Castro de Moura M, Stella G, Comoglio PM, Ruiz-Miró M, Matías-Guill X, Pazo-Cid R, Antón A, Lopez-Lopez R, Soler G, Longo F, Guerra I, Fernandez S, Plass C, Morales R, Carles J, Bowtell, Mileschkin L, Sia D, Tothill R, Tabernero J, Llovet JM, Esteller M. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2016 Aug; 16: 3090-97.

181. Chibaudel B, Henriques J, Rakez M, Brenner B, Won Kim T, Martínez-Villacampa M, Gallego J, Cervantes A, Shim K, Jonker D, Guerin V, Mineur L, Banzi C, Roth A, Moehler M, Aranda E, Van Cutsem E, Tabernero J, Schmoll HJ, Hoff P, Andre T, De Gramont A. Association of bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy with disease-free survival and overall survival in patients with stage II colon cancer. A secondary analysis of the AVANT Trial. *JAMA*. 2020; 3 (10): 1-13.
182. Auclin E, Taieb J, Lepage C, Aparicio T, Faroux R, Mini E, Folprecht G, Salazar R, Banzi M, Louvet C, Van Laethem JL, Taberner J, Hickish T, De Gramont A. Carcinoembryonic antigen levels and survival in stage III colon cancer: Post hoc analysis of the MOSAIC and PETACC-8 Trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019; 28: 1153-61.
183. Andre T, Venrneroy D, Im SA, Bodoky G, Buzzoni R, Reigold S, Rivera F, Mc Kendrick J, Scheitahuer W, Ravit G, Fountzilas G, Yong WP, Isaacs R, Osterlund P, Liang JT, Creemers GJ, Rakez M, Van Cutsem E, Cunningham D, Tabernero J, De Gramont A. Bevacizumab as adjuvant treatment of colon cancer: updated results from the S. AVANT phase III study by the GERCOR Group. *Ann Oncol*. 2020 Jan; 31 (2): 246-57.
184. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Mauer M, Tanis E, Van Cutsem E, Scheitahuer W, Gruenberger T. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC40983): long-term results of a randomized, controlled, phase III trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 1208-15.
185. Linnekamp JF, Wang X, Medema JP, et al. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes. *Cancer Research*. 2015; 75: 245-49.
186. Parseghian, C.M., Loree, J.M., Morris, V.K., Liu, X., Clifton, K.K., Napolitano,

S., Henry, J.T., Pereira, A.A., Vilar, E., Johnson, B., et al. (2019). Anti-EGFR resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann. Oncol.* 2019 oct 30; (23): 243–249.

187. Hiley C, De Bruin EC, Mc Granahan N. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biol.* 2014 jan; 14: 453-462.

188. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome landscapes. *Science.* 2013 mar; 339 (6127): 1456-1558.

189. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Teiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockage in colorectal cancers. *Nature.* 2012 jun 28; 486 (7404): 537-540.

190. Rusano M, Napolitano A, Ribelli G, Iuliani M, Simonetti S, Citarella F, Pantano F, Anesi C, Silvestris N, Argentiero A, Solimando AG, Vicenzi B, Tonini G, Santini D. Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors; the potentiality of blood samples. *Journal of experimental Clinical Cancer Res.* 2020 Nov; 39 (95): 1-13.

191. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, Goyal L, Levovitz C, Siravegna G, Livitz D, Rhrissorrakrai K, Martin EE, Van Seventer EE, Hanna M, Slowik K, Utró F, Pinto CJ, Wong A, Danysh BP, de la Cruz FF, Fetter IJ, Nades B, Shahzade HA, Allen JN, Blaszkowsky LS, Clark JW, Giantonio B, Murphy JE, Nipp RD, Roeland E, Ryan DP, Weekes CD, Kwak EL, Faris JE, Wo JY, Aguet F, Dey-Guha I, Hazar-Rethinam M, Dias-Santagata D, Ting DT, Zhu AX, Hong TS, Golub TR, Iafrate J, dalsteinsson VA, Bardelli A, Parida L, Juric D, Getz G, Corcoran RB. Liquid versus issue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med.* 2019 Sep; 25 (9): 1415-1421.

192. Thress, K.S., Brant, R., Carr, T.H., Dearden, S., Jenkins, S., Brown, H., Hammett, T., Cantarini, M., and Barrett, J.C. (2015). EGFR mutation detection in

ctDNA from NSCLC patient plasma: a cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer*. 2015 90, 509–51.

193. Siravegna, G., Mussolin, B., Buscarino, M., Corti, G., Cassingena, A., Crisafulli, G., Ponzetti, A., Cremolini, C., Amatu, A., Lauricella, C., et al. (2015). Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat. Med.* 2015 Jan;15 (3): 21, 827.

194. Kalikaki A, Politaki H, Souglakos J, Apostolaki S, Papadimitraki E, Georgoulia N, et al. KRAS genotypic changes of circulating tumor cells during treatment of patients with metastatic colorectal cancer. *PLoS One*. 2014;9 (8): e 104902.

195. Kilgour E, Rothwell DG, Brady G, Dive C. Liquid biopsy-based biomarkers of treatment response and resistance. *Cancer Cell*. 2020 april 13; 37: 485-495.

196. Brozos-Vazquez EM, Díaz-Peña R, García-González J, León-Mateos L, Mondelo-García P, Peña-Chilet M, López-López R. Immunotherapy in nonsmall-cell lung cancer: Current status and future prospects for liquid biopsy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2020, oct 28; (5): 7-21.

197. Rodriguez-Casanoca A, Costa-Fraga, Bao A, López-López R, Munielo-Rmay L, Díaz-Lagares A. Epigenetic Landscape of liquid biopsy in colorectal cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021 feb 5; 9: 622459.

198. Verbanac D, Ceri A, Hlapcic I, Shakibaei M, Bronckmueller A, Krusin B, Ljubicic N, Barsic N, Detel D, Baticic L, Rumora L, Somorac-Bakura A, Stefanovic M, Celap I, Demirovic A, Petlevski R, Petrik J, Grdic-Rajkovic M, Hulina-Tomaskovic A, Rako I, Saso L, Barisic K. Profiling Colorectal cancer in the landscape personalized testing-advantages of liquid biopsy. *Int J Mol Sci*. 2021 apr 21; 22 (9): 4327.

199. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-8686.

200. Martínez-Cardús A, Moran S, Musulen E, Moutinho C, Manzano JL, Martínez-Balibrea E, Tierno M, Elez E, Lnadolfi S, Lorden P, Arribas C, Muller F, Bock C, Tabernero J, Esteller M. Epigenetic homogeneity within colorectal tumors predicts shorter relapse-free and overall survival times for patients with locoregional cancer. *Gastroenterology*. 2016 jun 13; 151: 961-972
201. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Giola Subclassifications and their clinical significance. *Neurotherapeutics*. 2017 apr; 14 (2): 284-297.
202. Zhang YH, Li Z, Zeng T, Pan X, Chen L, Liu D, Li H, Huang T, Cai YD. Distinguishing glioblastoma subtypes by methylation signatures. *Frontiers in Genetics*. 2020 nov; 11 (11): 1-11.
203. Yuan C, Chen H, Tu S, Huang HY, Pan Y, Gui X, Kuang M, Shen X, Zheng Q, Zang Y, Cheng C, Hong H, Tao X, Peng Y, Yao X, Meng F, Ji H, Shao Z, Sun Y. A systematic dissection of the epigenomic heterogeneity of lung adenocarcinoma reveals two different subclasses with distinct prognosis and core regulatory networks. *Genome Biology*. 2021 Oct 13; 22 (156): 1-26.
204. Cros J, Raffene J, Couvelard A, Pote N. Tumor heterogeneity in pancreatic Adenocarcinoma. *Pathobiology*. 2018; 85: 64-71.
205. Zhang, J., Fujimoto, J., Zhang, J., Wedge, D.C., Song, X., Zhang, J., Seth, S., Chow, C.W., Cao, Y., Gumbs, C. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*. 2014 nov 12; 346, 256-259.
206. Yates, L.R., Gerstung, M., Knappskog, S., Desmedt, C., Gundem, G., Van Loo, P., Aas, T., Alexandrov, L.B., Larsimont, D., Davies, H., et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat. Med*. 2015 oct 7; 21: 751-759.

207. Thrane, K., Eriksson, H., Maaskola, J., Hansson, J., and Lundeberg, J. Spatially resolved transcriptomics enables dissection of genetic heterogeneity in stage III cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res.* 2018, nov 8; 78: 5970-5979.
208. Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 2012 jun 9; 366: 883-892.
209. Spaderma S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, Jung A, Kichner T, Brabletz T. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2006 sep; 131 (3): 830-840.
210. Dawson H, Lugli A. Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Front Med* 2015 aug 2 (11): 13-39.
211. Liu J, Beom-Cho Y, Hong HK, Wu S, Ebert PJ, Bray SM, Wong SS, Ting JC, Calley JN, Whittington CF, Bhagwat SV, Reinhard C, Wild R, Nam DH, Aggarwal A, Lee WY, Peng SB. Molecular dissection of CCR primary tumours and their matched liver metastases reveals critical role of immune microenvironment, EMT and angiogenesis in cancer metastasis. *Scientific Reports.* 2020 sep 3; 10: 10725-35.
212. Naxerova K, Jain R.K. Using tumour phylogenetics to identify the roots of metastasis in humans. *Nature Rev Clin Oncol.* 2015 May; 12 (5): 258-72.