

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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

Determinantes del patrón de distribución metastásica en cáncer colorrectal: caracterización de los pacientes con enfermedad permanentemente limitada al hígado

Autor:

Francesc Salvà Ballabrera

Directora:

María Elena Élez Fernández

Tutor:

Albert Selva O'Callaghan

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2025



TESIS DOCTORAL

Determinantes del patrón de distribución metastásica en cáncer colorrectal: caracterización de los pacientes con enfermedad permanentemente limitada al hígado

Autor:

Francesc Salvà Ballabrera

Directora:

María Elena Élez Fernández

Tutor:

Albert Selva O'Callaghan

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2025

A Sara
A Max, Luc y Maya

*“No abandonar aún el mundo merece un motivo digno
y ese es estar juntos, permanecer unidos
hemos coincidido en el espacio y en el tiempo
honremos al destino y compartamos el momento.
aunque nada es tan sencillo, y es todo tan moderno
convertimos cuestionarnos en un acto cotidiano
y es que si yo te quiero, te quiero en desarrollo
y jamás me permitiría ser escollo en tu camino.”*

Senderos a Roma - Lágrimas de Sangre

AGRADECIMIENTOS

A Sara, sin ella nada de esto hubiera podido empezar.

A Max, Luc y Maya, mi auténtica razón de ser.

A Marea, por llevarme a límites insospechados.

A Jaume i Cristina, por la paciencia infinita, o no, que han desarrollado conmigo.

A Quim, por estar lejos y cerca a la vez.

A Elena, por su sabiduría, su liderazgo, por todo.

A Raquel, Edu y Alba, condición *sine quan non*.

A Javi, por su energía.

A losune, por su docencia y meticulosidad.

A Nadia, por contagiarme su entusiasmo e ilusión con la profesión.

A Marta, por su humanidad.

A Ariadna, por hacer que todo funcione.

A Adriana, por aportar aire fresco al equipo.

A Alejandro y Ester, por enseñármelo todo cuando andaba perdido.

A Lorena, por compartir tantas cosas en tiempos oscuros.

A Ana y Lara, por su siempre buena predisposición.

Al resto integrantes de la unidad de colon, por soportarme, por ayudarme.

A Josep, por crear el microambiente adecuado para crecer.

Al Servicio de Oncología médica de Vall d'Hebrón, por estimularme.

Al VHIO, por acompañarme.

Al resto de mi familia, de quien tengo la suerte de aprender y disfrutar a diario.

A mis compañeros de Mataró, por completarme.

A mis amigos de Parets, por cuidar de Fran y disfrutar de Cesc.

A mis amigos de la Universidad, por enseñarme a vivir.

A mis amigos de Cardedeu, por el soporte infinito.

A todos los que me habéis ayudado, por vuestra generosidad.

A los pacientes y sus familias, por el aprendizaje continuo.

A los que se han ido, por seguir aún conmigo.

A Sara, sin ella no habría podido acabar. Sin ella, no tendría sentido continuar.

“La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros diez más”

George Bernard Shaw

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

A

ADN, ácido desoxirribonucleico
 ADNtc, ácido desoxirribonucleico tumoral circulante
 AJCC, del inglés, American joint committee on cancer
 ARN, ácido ribonucleico
 ARNm, ácido ribonucleico mensajero
 APC, del inglés, adenomatous polyposis coli

B

BRAF, del inglés, rapidly accelerated fibrosarcoma B-type

C

CAPOX, capecitabina + oxaliplatino
CDK12, del inglés, cyclin dependent kinase 12
CDKN2A del inglés, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
 CEA, antígeno carcinoembrionario
 CMS, del inglés, consensus molecular subtype
 Col. Colaboradores.
 CpG, del inglés, citosina phospho guanina
CSFR1 del inglés, Colony Stimulating Factor 1 Receptor
CTNNB1 del inglés, catenin beta 1

D

ddPCR, del inglés, droplet digital polymerase chain reaction
 dMMR, del inglés, mismatch repair deficiency
DKK1, del inglés, dickkopf 1
 dL, decilitro

E

ECOG, del inglés, eastern cooperative oncology group
EGFR, del inglés, epidermal growth factor receptor
EMP1, del inglés, epithelial membrane protein 1
ERBB2, del inglés, v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

ERBB3, del inglés, v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3

F

FAM, fracción alélica mutada
FGFR3 del inglés, fibroblast growth factor receptor 3
 FOLFIRI, 5-fluoracilo + leucovorin + irinotecan
 FOLFOX, 5-fluoracilo + leucovorin + oxaliplatino
 FOLFOXIRI, 5-fluoracilo + leucovorin + oxaliplatino + irinotecan

G

GLOBOCAN, del inglés, global cancer observatory
GNAS del inglés, guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha

H

HER2, del inglés, human epidermal growth factor receptor 2
HICAM, del inglés, histopathological, clinical, and molecular
HIF-1α, del inglés, hypoxia-inducible factor - 1α
 HR, del inglés, hazard ratio
 HRC, del inglés, high relapse cells

I

IC, intervalo de confianza
IGF-1, del inglés, insulin-like growth factor 1
 IHQ, inmunohistoquímica

J

K

KRAS, del inglés, kirsten rat sarcoma oncogene

L

LMS, del inglés, liver molecular subtype

M

m, meses

MAPK, del inglés, mitogen-activated protein kinase

MAP2K1 del inglés, mitogen-activated protein kinase kinase 1

mg, microgramo

mL, mililitro

MSI, del inglés, microsatellite instability

MSS, del inglés, microsatellite stability

N

NGS, del inglés, next generation sequencing

NRAS, del inglés, neuroblastoma rat sarcoma oncogene

NRF2 del inglés, nuclear factor erythroid 2-related factor 2

ng, nanogramo

NGS, del inglés, next generation sequencing

O

P

PDGFRA del inglés, platelet-derived growth factor receptor A

PIK3CA del inglés, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PIK3C2B, del inglés, phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit 2β

PIK3R1 del inglés, phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1

PCR, del inglés, polymerase chain reaction

pMMR, del inglés, mismatch repair proficiency

PTEN, del inglés, phosphatase and tensin homolog

Q

R

RAS, del inglés, rat sarcoma oncogene

REDECAN, red española de registros de cáncer

RET del inglés, rearranged during transfection

RNA-seq, del inglés, ribonucleic acid sequencing

RNF43 del inglés, ring finger protein 43

RTK, del inglés, receptor tyrosine kinase

S

SG, supervivencia global

SLP, supervivencia libre de progresión

SLR, supervivencia libre de recaída

SMAD 3, del inglés, mothers against decapentaplegic homolog 3

SMAD 4, del inglés, mothers against decapentaplegic homolog 4

SMARCB1 del inglés, SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1

STK11 del inglés, serine/threonine kinase 11

SWI/SNF, del inglés, switch/sucrose nonfermenting

T

TCGA, del inglés, the cancer genome atlas

TGFβ del inglés, transforming growth factor-beta

TEM, transición epitelio mesénquima

TIMP-2, del inglés, tissue inhibitor of metalloproteinases-2

TNM, del inglés, tumor-node-metastasis

TOR, del inglés, target of rapamycin

U

V

VHIO, del inglés, Vall hebron institute of oncology

VHL, del inglés, Von Hippel-Lindau

W

WNT del inglés, Wingless-related integration site

X

Y

Z

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etiología y factores de riesgo asociados al CCR.....	32
Figura 2. Fases del proceso de carcinogénesis del CCR.	33
Figura 3. Vías de carcinogénesis en CCR.....	35
Figura 4. Modelos del proceso de formación de metástasis.	36
Figura 5. Proceso de invasión y metástasis en el cáncer.	36
Figura 6. Patrones de crecimiento histológico de las metástasis hepáticas en CCR. .	41
Figura 7. Determinantes organotrópicos de las metástasis hepáticas en CCR.....	42
Figura 8. Terapias locorregionales de las metástasis hepáticas en CCR..	57
Figura 9. Comparación entre los índices pronósticos de Fong y de Oslo.	69
Figura 10. Factores organotrópicos de los patrones metastásicos en CCR y enfoques terapéuticos potenciales según el patrón de diseminación.....	75
Figura 11. Diagrama de flujo de la población en estudio y de las cohortes incluidas en el análisis.....	82
Figura 12. Diagrama de flujo del estudio con el número de pacientes y de análisis realizados en cada una de las tres cohortes.	90
Figura 13. Distribución de frecuencia de las tres cohortes en la población de estudio.....	91
Figura 14. Distribución de tumores sincrónicos y metacrónicos en las diferentes cohortes analizadas.....	93
Figura 15. Distribución de la localización tumoral en las diferentes cohortes analizadas..	93
Figura 16. Dinámica temporal de la progresión de la enfermedad en pacientes de las cohortes con fenotipos clínicos extremos.....	94
Figura 17. Flujos de transición de pacientes entre cohortes a lo largo del tiempo.	95
Figura 18. Tiempo desde el diagnóstico hasta la aparición de metástasis en diferentes subgrupos de pacientes.....	96
Figura 19. Tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta el desarrollo de metástasis en una nueva localización.....	97
Figura 20. Proporción de pacientes con estudio molecular realizado..	98
Figura 21. Número de mutaciones identificadas en las cohortes del estudio y su distribución..	100
Figura 22. Número de mutaciones patogénicas por muestra en las tres cohortes....	101
Figura 23. Número de genes mutados por muestra en las tres cohortes.....	101
Figura 24. Representación gráfica mediante oncoplot de los genes mutados y su distribución en las tres cohortes del estudio.....	105

Figura 25. Representación gráfica de la distribución de las 10 mutaciones más comunes en la población del estudio, agrupadas entre las tres cohortes del estudio.	105
Figura 26. Representación gráfica mediante Oncoplot de los genes mutados y su distribución según la presencia o ausencia de metástasis hepáticas (cohortes A+B vs C).....	106
Figura 27. Representación gráfica mediante Oncoplot de los genes mutados y su distribución según la presencia o ausencia de metástasis extrahepáticas (cohortes A vs B+C).	107
Figura 28. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada <i>hallmark</i> del cáncer según <i>Cancer Hallmark Genes</i>	109
Figura 29. Correlación entre las cohortes del estudio y los <i>hallmarks</i> del cáncer según <i>Cancer Hallmark Genes</i>	111
Figura 30. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada <i>hallmark</i> del cáncer según <i>Cosmic Gene Consensus Hallmarks</i>	113
Figura 31. Correlación entre las cohortes del estudio y los <i>hallmarks</i> del cáncer según <i>Cosmic Gene Consensus Hallmarks</i>	115
Figura 32. Intersección de genes entre <i>Cancer Hallmarks Genes</i> , <i>Cosmic Gene Consensus Hallmarks</i> y los genes evaluados en nuestra población.	116
Figura 33. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada <i>hallmark</i> del cáncer según la unión de <i>Cancer Hallmarks Genes (CHG)</i> y <i>Cosmic Gene Consensus Hallmarks</i>	117
Figura 34. Correlación entre las cohortes del estudio y los <i>hallmarks</i> del cáncer según <i>Cancer Hallmarks Genes</i> y <i>Cosmic Gene Consensus Hallmarks</i>	119
Figura 35. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada vía de señalización del cáncer según <i>Oncogenic Signaling Pathways</i>	121
Figura 36. Distribución de los genes evaluados exclusivamente con panel 300 y su asociación con cada vía de señalización del cáncer según <i>Oncogenic Signaling Pathways</i>	123
Figura 37. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada proceso biológico asociado al cáncer según <i>Pancancer Significantly Mutated Genes</i>	126
Figura 38. Proporción de pacientes con estudio VIGex realizado.....	128
Figura 39. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex en las distintas cohortes del estudio.....	130
Figura 40. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex según la presencia o no de metástasis hepáticas.....	130
Figura 41. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex según la localización del tumor primario.	131

Figura 42. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex según la localización del tumor primario y en función de la presencia o no de afectación hepática.....	131
Figura 43. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex según la afectación metastásica sincrónica y metacrónica en cada cohorte.....	132
Figura 44. Supervivencia global por cohortes desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica.	133
Figura 45. Supervivencia global por subgrupos desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica.	133
Figura 46. Supervivencia global según el momento de aparición de la enfermedad metastásica (sincrónica o metacrónica).	134
Figura 47. Supervivencia global por cohortes en función de los resultados de VIGex.	135

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación molecular de las metástasis hepáticas en CCR.	49
Tabla 2. Comparativa entre los principales índices pronósticos quirúrgicos para las metástasis hepáticas de CCR.	51
Tabla 3. Principales estudios sobre el valor pronóstico del ADNtc postquirúrgico en las metástasis hepáticas de CCR.	54
Tabla 4. Principales estudios con terapias locorregionales para las metástasis hepáticas en CCR.	63
Tabla 5. Características demográficas y clínicas de la población total y de las cohortes del estudio.	92
Tabla 6. Distribución de las muestras según los paneles realizados en cada cohorte del estudio.	98
Tabla 7. Procedencia de las muestras evaluadas con el panel VHIO card-300.	99
Tabla 8. Procedencia de las muestras evaluadas con el Amplicon.	99
Tabla 9. Número de genes analizados, mutaciones y variantes patogénicas según técnicas empleadas.	99
Tabla 10. Mediana de mutaciones patogénicas y genes mutados en las tres cohortes.	101
Tabla 11. Número y porcentaje de muestras con mutaciones patogénicas por gen y cohorte.	102
Tabla 12. Análisis de la asociación entre mutaciones genéticas y las cohortes del estudio.	103
Tabla 13. Comparación de la distribución de <i>APC</i> y <i>KRAS</i> entre las cohortes del estudio.	104
Tabla 14. Número de genes incluidos en cada <i>hallmark</i> del cáncer según la base de datos Cancer Hallmark Genes y su representación en nuestra población de estudio.	108
Tabla 15. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo y los distintos <i>hallmarks</i> según la base de datos <i>Cancer Hallmark Genes</i>	110
Tabla 16. Número de genes incluidos en cada <i>hallmark</i> del cáncer según la base de datos <i>Cosmic Gene Consensus Hallmarks</i> y su representación en nuestra población de estudio.	112
Tabla 17. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo y los distintos <i>hallmarks</i> según la base de datos <i>Cosmic Gene Consensus Hallmarks</i>	114

Tabla 18. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo y los distintos <i>hallmarks</i> según la unión de las bases de datos de <i>Cancer Hallmarks Genes</i> y <i>Cosmic Gene Consensus Hallmarks</i>	118
Tabla 19. Número de genes incluidos en cada vía de señalización del cáncer según la base de datos <i>Oncogenic Signaling Pathways</i> y su representación en nuestra población de estudio	120
Tabla 20. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo y las distintas vías de señalización según <i>Oncogenic Signaling Pathways</i>	122
Tabla 21. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo, analizados únicamente con panel 300, y las distintas vías de señalización según <i>Oncogenic Signaling Pathways</i> ,.....	123
Tabla 22. Correlación entre las cohortes del estudio y las distintas vías de señalización según <i>Oncogenic Signaling Pathways</i>	124
Tabla 23. Número de genes incluidos en cada proceso biológico asociado al cáncer según la base de datos <i>Pancancer Significantly Mutated Genes</i> y su representación en nuestra población de estudio.	125
Tabla 24. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada proceso biológico asociado al cáncer según <i>Pancancer Significantly Mutated Genes</i>	127
Tabla 25. Características demográficas y clínicas de la población total y de las cohortes del estudio con análisis de VIGex disponible.	129
Tabla 26. Distribución de los resultados de VIGex en las diferentes cohortes del estudio.....	129

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	22
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. Generalidades del cáncer colorrectal	30
1.1.1. Epidemiología	30
1.1.2. Diagnóstico	30
1.1.3. Proceso de carcinogénesis.....	31
1.2. Proceso de invasión y desarrollo de metástasis hepáticas en cáncer colorrectal	35
1.2.1. Invasión local de las células tumorales en la matriz extracelular..	37
1.2.2. Intravasación de las células tumorales en el sistema circulatorio.	37
1.2.3. Transporte sistémico de las células tumorales	38
1.2.4. Extravasación de células tumorales en el parénquima hepático ..	38
1.2.5. Colonización del hígado y establecimiento de tumores macroscópicos.....	39
1.3. Características de las metástasis hepáticas en el cáncer colorrectal.....	40
1.3.1. Patrones de crecimiento	40
1.3.2. Determinantes organotrópicos.....	42
1.3.2.1. Patrones de circulación	42
1.3.2.2. Firmas tumorales específicas	43
1.3.2.3. Nichos específicos de órganos y tolerancia inmunológica de las metástasis hepáticas.....	44
1.3.3. Características moleculares	46
1.3.4. Enfermedad metastásica limitada al hígado.	49
1.3.5. Factores pronósticos	50
1.3.5.1. Biopsia líquida y metástasis hepáticas	53

1.4. Tratamiento de las metástasis hepáticas	54
1.4.1. Cirugía	55
1.4.2. Otros tratamientos loco-regionales	57
1.4.2.1. Ablación térmica	58
1.4.2.2. Radioterapia estereotáctica corporal	59
1.4.2.3. Radioembolización transarterial (TARE)	60
1.4.2.4. Quimioterapia intraarterial	61
1.4.2.5. Quimioembolización transarterial	62
1.4.3. Tratamiento sistémico	64
1.4.3.1. Tratamiento perioperatorio	64
1.4.3.2. Tratamiento neoadyuvante	65
1.4.3.3. Tratamiento adyuvante	67
1.4.4. Trasplante hepático	67
1.5. Enfermedad hepática permanentemente limitada al hígado.....	70
2. JUSTIFICACIÓN	72
3. HIPÓTESIS	76
3.1. Hipótesis primaria.....	77
3.2. Hipótesis secundarias.....	77
4. OBJETIVOS.....	78
4.1. Objetivo primario	79
4.2. Objetivos secundarios	79
5. MÉTODOS.....	80
5.1. Tipo de estudio	81
5.2. Selección de la cohorte de estudio y criterios de inclusión	81
5.3. Variables clínicas, patológicas y moleculares del estudio	82
5.4. Análisis de los parámetros moleculares del estudio.....	83
5.4.1. Análisis molecular de <i>RAS</i> , <i>BRAF</i> ^{V600E} e MSI.....	83

5.4.2. Análisis del perfil molecular ampliado mediante Amplicon Hplex, Panel VHIO card-300 y VIGex.	84
5.5. Análisis estadístico.....	86
6. RESULTADOS	89
6.1. Características basales de la población de estudio	90
6.2. Características clínico-patológicas de la población de estudio ...	91
6.2.1. Evolución temporal de los patrones de distribución metastásica.	94
6.3. Perfil molecular de los distintos grupos de estudio	97
6.3.1. Características de las muestras analizadas.....	97
6.3.2. Genes incluidos en el análisis.....	99
6.3.3. Resultados moleculares comparativos entre las cohortes del estudio	100
6.3.3.1. Resultados moleculares agrupando cohortes del estudio	106
6.3.4. Análisis molecular por agrupación de genes	107
6.3.4.1. Análisis molecular basado en Cancer Hallmark Genes.	108
6.3.4.2. Análisis molecular basado en Cosmic Gene Consensus Hallmarks. .	111
6.3.4.3. Análisis molecular basado en la unión de Cancer Hallmarks Genes y Cosmic Gene Consensus Hallmarks.	115
6.3.4.4. Análisis molecular basado en Oncogenic Signaling Pathways	119
6.3.4.5. Análisis molecular basado en Pancancer Significantly Mutated Genes.....	124
6.4. Contexto inmunológico del tumor asociado al patrón de diseminación	127
6.5. Correlación entre el patrón de distribución de metástasis y la supervivencia	132
7. DISCUSIÓN	136
7.1. Selección de la muestra	137
7.2. Características clínicas y patológicas de la población del estudio.....	140

7.2.1. Enfermedad sincrónica vs. metacrónica	141
7.3. Características moleculares de la población de estudio.....	142
7.3.1. Perfil de mutaciones por cohortes del estudio.	142
7.3.2. Análisis en función de agrupaciones de mutaciones	145
7.3.2.1. Agrupación en función de hallmarks del cáncer.....	146
7.3.2.2. Agrupación en función de vías de señalización	148
7.3.2.3. Agrupación en función de procesos biológicos	149
7.4. Determinación de VIGex en la población de estudio	150
7.5. Correlación con supervivencia global	156
7.6. Principales limitaciones del estudio	157
8. CONCLUSIONES	162
9. LÍNEAS FUTURAS.....	165
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
11. ANEXO.....	185

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

El cáncer colorrectal metastásico (CCRm) sigue un patrón de diseminación no aleatorio, con un 20% de pacientes cuya enfermedad permanece siempre confinada al hígado. Identificar precozmente a esta población permitiría anticipar su evolución y adaptar las estrategias terapéuticas, con un impacto significativo en supervivencia y calidad de vida. Factores intrínsecos del tumor y del microambiente influyen en este organotropismo. En este sentido, la secuenciación de nueva generación (NGS) ha generado un volumen sin precedentes de datos genómicos disponibles, abriendo la posibilidad de identificar posibles patrones de mutaciones específicos. Se plantea la hipótesis de que los pacientes con CCRm y enfermedad permanentemente limitada al hígado pueden tener unas características tumorales intrínsecas determinadas y diferentes a la de los pacientes que desarrollan enfermedad extrahepática. El objetivo es caracterizar a estos pacientes desde el punto de vista clínico-patológico, molecular y del contexto inmunológico del tumor.

Material y métodos

Se realizó un análisis retrospectivo de pacientes con CCRm irresecable tratados en el Hospital Vall de Hebrón entre 2010 y 2019, excluyendo aquellos con mutaciones *BRAF*^{V600E} y/o inestabilidad de microsatélites (MSI). La población fue clasificada en tres cohortes según el patrón de distribución metastásica: cohorte A, pacientes con enfermedad permanentemente limitada al hígado; cohorte B, pacientes con metástasis hepáticas y extrahepáticas; y cohorte C, pacientes con afectación exclusivamente extrahepática. Se analizaron las características clínico-patológicas, los perfiles moleculares y el contexto inmunológico (VIGex) de cada cohorte, utilizando datos del programa de cribado del VHIO. Además, se evaluó el impacto pronóstico del patrón de distribución metastásica.

Resultados

Se incluyeron 1263 pacientes, de los cuales se excluyeron 237 por presentar mutaciones de *BRAF*^{V600E} y/o MSI. De los 1.026 pacientes restantes, 204 (19.9%) correspondieron a la cohorte A, 525 (51.2%) a la cohorte B y 297

(28.9%) a la cohorte C. Se observó una menor proporción de lesiones metastásicas metacrónicas en la cohorte A (15%) en comparación con la cohorte B (23%) y, especialmente, con la cohorte C (59%), diferencia que resultó estadísticamente significativa ($p=0.005$). Asimismo, se identificaron diferencias en la localización del tumor primario, encontrándose tumores en el recto en el 15%, 24% y 28% de los casos en las cohortes A, B y C, respectivamente ($p=0.005$). A nivel molecular, las mutaciones más frecuentes fueron en *APC*, *TP53* y *KRAS*. Aunque las mutaciones se distribuyen de manera homogénea entre las distintas cohortes, destaca una menor presencia de mutaciones en *KRAS* en la cohorte A (43%) en comparación con las cohortes B y C, con un 59% y 62% respectivamente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.043$). La cohorte B mostró un enriquecimiento en cinco de los diez *hallmarks* del cáncer evaluados: invasión y metástasis, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, proliferación sostenida y capacidad replicativa inmortal. El análisis mediante VIGex mostró una menor proporción de tumores *cold* en la cohorte C, en comparación con las cohortes con metástasis hepáticas (A + B), con un 2.6% frente a un 19.8% ($p=0.041$). Además, la cohorte C presentó una mayor supervivencia global, con 32 meses, en comparación con 22 meses en la cohorte A y 24 meses en la cohorte B ($p<0.001$).

Conclusiones

Se observa que en el CCRm irresecable, aproximadamente un 20% de los pacientes presenta metástasis permanentemente confinadas al hígado, caracterizándose estos pacientes por presentar una mayor frecuencia de metástasis sincrónicas, menor afectación rectal y una menor prevalencia de mutaciones en *KRAS*. En contraste, los pacientes con afectación múltiple (hepática y extrahepática) muestran un enriquecimiento en varios *hallmarks* del cáncer y en la vía WNT, a expensas de mutaciones en *APC*, lo que podría sugerir la necesidad de tener que adaptarse a distintos órganos/microambientes. Aunque las diferencias moleculares encontradas son estadísticamente significativas, su magnitud es clínicamente poco relevante. Destaca el perfil inmunológico determinado en el tumor primario, con una mayor proporción de tumores *cold* en pacientes con metástasis hepáticas, un fenómeno que requiere mayor investigación.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction

Metastatic colorectal cancer (mCRC) follows a non-random dissemination pattern, with 20% of patients exhibiting liver-limited disease throughout its course. Early identification of this subgroup could help anticipate disease progression and tailor therapeutic strategies, significantly impacting survival and quality of life. Tumor-intrinsic factors and the tumor microenvironment play a key role in this organotropism. In this context, next generation sequencing (NGS) has generated an unprecedented volume of mutational data, creating opportunities to identify potential mutation patterns linked to metastatic behavior. It is hypothesized that patients with permanent liver-liver mCRC may have distinct intrinsic tumor characteristics compared to those with extrahepatic disease. This study aims to comprehensively characterize these patients from a clinicopathological, molecular, and immunological perspective.

Materials and Methods

A retrospective analysis was conducted on patients with unresectable mCRC treated at Hospital Vall de Hebrón between 2010 and 2019, excluding those with *BRAF*^{V600E} mutations and/or microsatellite instability (MSI). The population was classified into three cohorts based on metastatic distribution patterns: cohort A, patients with permanent liver-liver disease; cohort B, patients with both hepatic and extrahepatic metastases; and cohort C, patients with extrahepatic-only disease. Clinicopathological characteristics, molecular profiles, and tumor immune contexture (VIGex) were analyzed for each cohort using data from the VHIO screening program. Additionally, the prognostic impact of metastatic distribution patterns was evaluated.

Results

Out of 1,263 patients analyzed, 237 were excluded due to *BRAF*^{V600E} mutations and/or MSI. Among the 1,026 eligible patients, 204 (19.9%) presented with liver-confined metastases (Cohort A), 525 (51.2%) had both hepatic and extrahepatic involvement (Cohort B), and 297 (28.9%) had exclusively extrahepatic disease (Cohort C). Cohort A demonstrated a significantly lower proportion of

metachronous metastases (15%) compared to Cohorts B (23%) and C (59%) ($p=0.005$). Additionally, rectal primary tumors were less frequent in Cohort A (15%) than in Cohorts B (24%) and C (28%) ($p=0.005$). Molecular analysis revealed frequent mutations in *APC*, *TP53*, and *KRAS* across cohorts, with a notable lower frequency of *KRAS* mutations in Cohort A (43%) compared to Cohorts B and C (59% and 62%, respectively; $p=0.043$). Cohort B exhibited enrichment in five cancer hallmarks: activation of invasion and metastasis, evasion of growth suppressors, resistance to cell death, sustained proliferative signaling, and replicative immortality, whereas signaling pathways and other oncogenic processes remained consistent across groups. Analysis of the primary tumor showed that Cohort C had a significantly lower prevalence of 'cold' immune phenotypes (2.6%) compared to cohorts with hepatic involvement (19.8%, $p=0.041$). Additionally, Cohort C demonstrated superior overall survival, with a median of 32 months, compared to 22 months in Cohort A and 24 months in Cohort B ($p<0.001$).

Conclusions

In unresectable mCRC, approximately 20% of patients present permanent liver-limited disease, characterized by a higher frequency of synchronous metastases, lower rectal involvement, and a lower prevalence of *KRAS* mutations. In contrast, patients with hepatic and extrahepatic disease exhibit enrichment in several cancer hallmarks and the WNT pathway, primarily driven by *APC* mutations, suggesting a potential need for tumor adaptation to distinct organ microenvironments. Although the observed molecular differences are statistically significant, their clinical relevance remains limited. Notably, the immune profile of the primary tumor reveals a higher proportion of cold tumors in patients with hepatic metastases, a phenomenon that warrants further investigation.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del cáncer colorrectal

1.1.1. Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un reto importante para la salud pública a nivel mundial. Según los datos de GLOBOCAN, el CCR es el tercer cáncer más frecuente diagnosticado en el mundo, con más de 1.9 millones de nuevos casos en el año 2022, siendo la causa de aproximadamente el 9.6% de todas las muertes relacionadas con cáncer (1). Asimismo, se estima que su incidencia se incrementará hasta un 2.5 millones de nuevos casos en el año 2035 (2). En los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia de CCR en pacientes jóvenes en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados (3). Se estima que esta tendencia continuará en los próximos años, con un aumento previsto en la incidencia de cáncer de colon y recto del 90% y 124%, respectivamente, en pacientes de entre 20 y 34 años para el año 2030 (4). En nuestro país, según datos de la REDECAN, la incidencia estimada para el año 2024 era de 44.294 casos, siendo actualmente, en conjunto, el tumor más frecuentemente diagnosticado en ambos sexos (5).

1.1.2. Diagnóstico

El CCR se estadifica utilizando el sistema de clasificación y estadificación TNM de la octava edición de la AJCC. En este sistema, los estadios se asignan en función de las características del tumor primario (T) y del grado de afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis a distancia (M). Se considera estadio I cuando hay afectación maligna hasta la muscular propia, estadio II cuando hay afectación de tejidos adyacentes o de órganos vecinos y estadio III cuando existen ganglios regionales afectados. El estadio IV se caracteriza por la presencia de metástasis, siendo estadio IVa cuando hay enfermedad a distancia afectando a un solo órgano, estadio IVb si hay más de un órgano afecto y estadio IVc si hay enfermedad diseminada a nivel peritoneal (6).

Los pacientes que son diagnosticados con enfermedad más avanzada presentan un peor pronóstico (7,8). Un reciente análisis de 16 registros de CCR de 9 países europeos, y que incluye 4 regiones de España, ha demostrado supervivencias a los 5 años en los estadios I del 89.1%, en los estadios II del 81.2%, en los estadios III del 69.4% y en los estadios IV del 15.4% (9).

La implementación de los programas de cribado ha demostrado su capacidad para diagnosticar a los pacientes en estadios más iniciales y/o en fase asintomática. En el estudio previamente mencionado donde se analiza el impacto del cribado en 9 países europeos, se observa un cambio significativo en el estadio al diagnóstico según si el paciente es diagnosticado dentro o fuera del programa de cribado. Los estadios al diagnóstico son, respectivamente: estadio I, 43% en pacientes cribados frente a 18.6% en no cribados; estadio II, 22.6% frente a 25%; estadio III, 26.8% frente a 29.1%; y estadio IV, 7.6% frente a 27.3%. (9).

En España, el programa de cribado se realiza mediante la detección bienal de sangre oculta en heces en hombres y mujeres con edades comprendidas entre 50 y 69 años. En caso de resultado positivo, se completa el estudio mediante la realización de una colonoscopia (10). A pesar del impacto positivo del cribado en el pronóstico de los pacientes en el momento del diagnóstico, aproximadamente el 30-40% de los pacientes diagnosticados en estadios iniciales presentará una recaída de su enfermedad (11–13). Alrededor del 95% de estas recidivas se producen en los 5 primeros años, siendo el 85% de ellas en los 3 primeros años tras la resección quirúrgica del tumor primario (14,15). La diseminación del cáncer desde el tumor primario hacia órganos distantes representa, sin duda, uno de los aspectos más devastadores de la enfermedad.

1.1.3. Proceso de carcinogénesis

El CCR es una patología compleja y variada, originada por la acumulación de múltiples cambios genéticos a lo largo del tiempo. La mayoría de los casos surgen de manera esporádica, aunque hasta un 5-7% se atribuye a síndromes hereditarios (16). Además, alrededor del 25% de los casos se clasifican como

CCR familiar, lo que indica una posible predisposición genética sin estar claramente asociados a síndromes hereditarios conocidos. Los familiares de individuos con CCR tienen un riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad, posiblemente debido a la combinación de estilos de vida compartidos y exposiciones ambientales similares, aunque en muchos casos la causa genética específica desencadenante no se determina con claridad (17). En la figura 1 se resumen las principales causas asociadas al CCR.

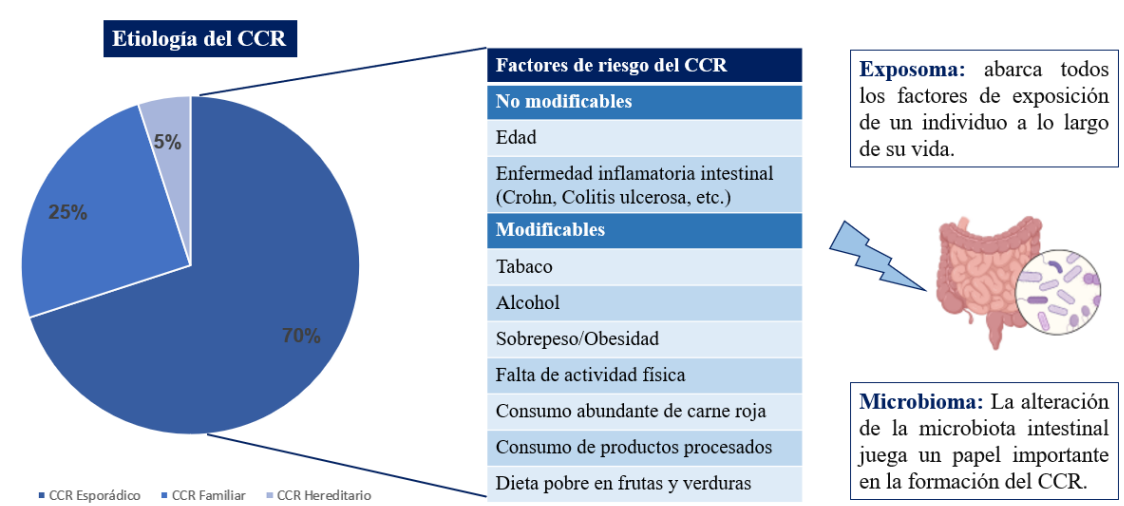


Figura 1. Etiología y factores de riesgo asociados al CCR. Adaptado de “Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies” (18).

Es crucial señalar que la gran mayoría de los CCR ocurren de manera esporádica, siendo el exposoma un factor determinante en su desarrollo. El exposoma engloba todas las exposiciones ambientales de un individuo a lo largo de su vida, incluidos la dieta, el ejercicio, la exposición a sustancias químicas, la radiación o el estrés psicosocial, entre otros. Estas exposiciones pueden interactuar con el genoma y epigenoma de una persona, favoreciendo el desarrollo de CCR (19). Por ejemplo, dietas altas en carnes rojas y procesadas y bajas en frutas, verduras y fibra se han vinculado a un aumento en el riesgo de CCR. Factores como la obesidad, el consumo de alcohol, el tabaquismo y la exposición a carcinógenos ambientales también elevan el riesgo de esta enfermedad.

La interacción de estas exposiciones con el genoma y epigenoma a lo largo de la vida de una persona puede iniciar la transformación de células normales en malignas. Este proceso de carcinogénesis, resumido en la figura 2, presenta principalmente tres etapas: iniciación, promoción y progresión. En la iniciación, las células adquieren mutaciones debido a daños en el ADN, ya sea por errores internos o por exposición a los agentes externos previamente mencionados. Estas mutaciones pueden activar oncogenes o desactivar genes supresores de tumores, favoreciendo la proliferación celular. Durante la promoción, las células mutadas son impulsadas a crecer y dividirse por hormonas, factores de crecimiento y otros agentes, acumulando más mutaciones y cambios epigenéticos que promueven su crecimiento descontrolado. Finalmente, en la progresión, las células adquieren capacidades invasivas y metastásicas, desarrollando tumores primarios mayores y la capacidad de diseminarse a otros órganos (20). Es importante destacar que la carcinogénesis es un proceso dinámico y multifactorial, y que las diferentes etapas de la carcinogénesis pueden ocurrir en diferentes momentos y en diferentes tejidos dentro del cuerpo, lo que hace que el proceso sea altamente variable y complejo.

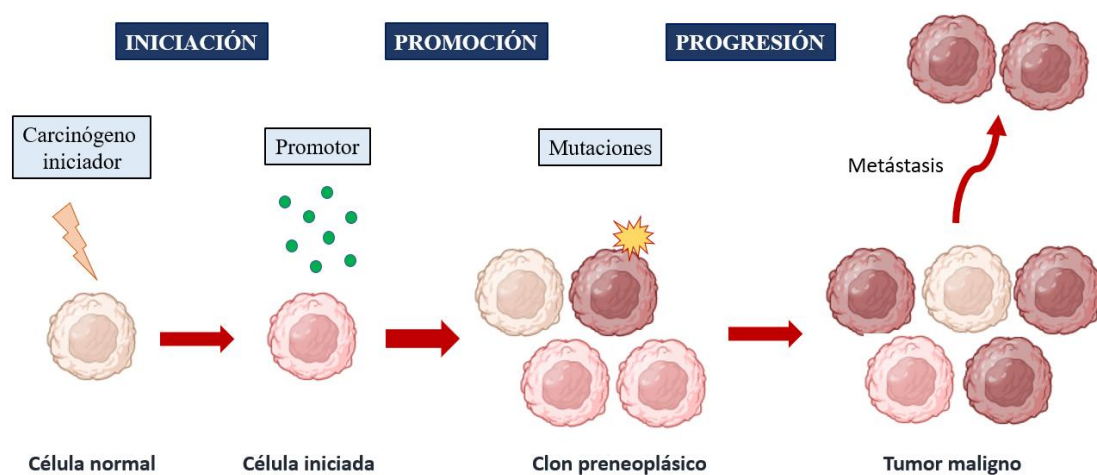


Figura 2. Fases del proceso de carcinogénesis del CCR. Adaptado de "DNA Damage, Mutagenesis and Cancer" (21).

En el CCR se han identificado diversas vías moleculares involucradas en la carcinogénesis, las cuales abarcan mecanismos genéticos y epigenéticos interrelacionados que contribuyen al proceso de desarrollo tumoral. Estas vías se representan resumidas en la figura 3 (20).

Inestabilidad Cromosómica (IC): Esta vía, implicada en el 65-70% de los casos, se caracteriza por cambios estructurales visibles citogenéticamente en los cromosomas, como deleciones, amplificaciones, inversiones y translocaciones. Estos cambios alteran el contenido génico y provocan la pérdida de heterocigosidad en regiones específicas. Se asocia con la secuencia adenoma-carcinoma propuesta por Vogelstein, comenzando con mutaciones en el gen *APC* que desregulan la vía de WNT, promoviendo la formación de adenomas (22,23). Con el tiempo, mutaciones adicionales en genes como *KRAS* y *TP53* llevan a un crecimiento descontrolado y eventualmente al CCR (24).

Inestabilidad de Microsatélites (MSI): Representando el 15-20% de los casos de CCR, la MSI es consecuencia de los defectos en el sistema de reparación del ADN, afectando principalmente a las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 (16,25). Este defecto es crucial en el síndrome hereditario no polipósico o síndrome de Lynch. Los tumores esporádicos con MSI a menudo surgen por silenciamiento epigenético de *MLH1* y pueden estar asociados con mutaciones en *BRAF* (20). Estos tumores suelen tener mejor pronóstico en estadios localizados, pero peor en enfermedad avanzada. La MSI aumenta la carga mutacional y la producción de neoantígenos, activando la respuesta inmunitaria y favoreciendo la respuesta a la inmunoterapia.

Vía del Fenotipo Metilador de Islas CpG (FMIC): Conocida también como la vía serrada, involucra la hipermetilación de islas CpG en promotores de genes cruciales para funciones como la apoptosis y la reparación del ADN, silenciándolos (26). Estos tumores pueden asociarse con alteraciones de genes de reparación del ADN como *MGMT* o *PI3KCA* (27). Clínicamente, estos tumores son más prevalentes en mujeres, localizados proximalmente en el colon y también presentan mutaciones en *BRAF* (28).

Cada vía subraya un mecanismo distinto por el cual las células colónicas pueden progresar hacia el cáncer, resaltando la complejidad y diversidad del CCR.

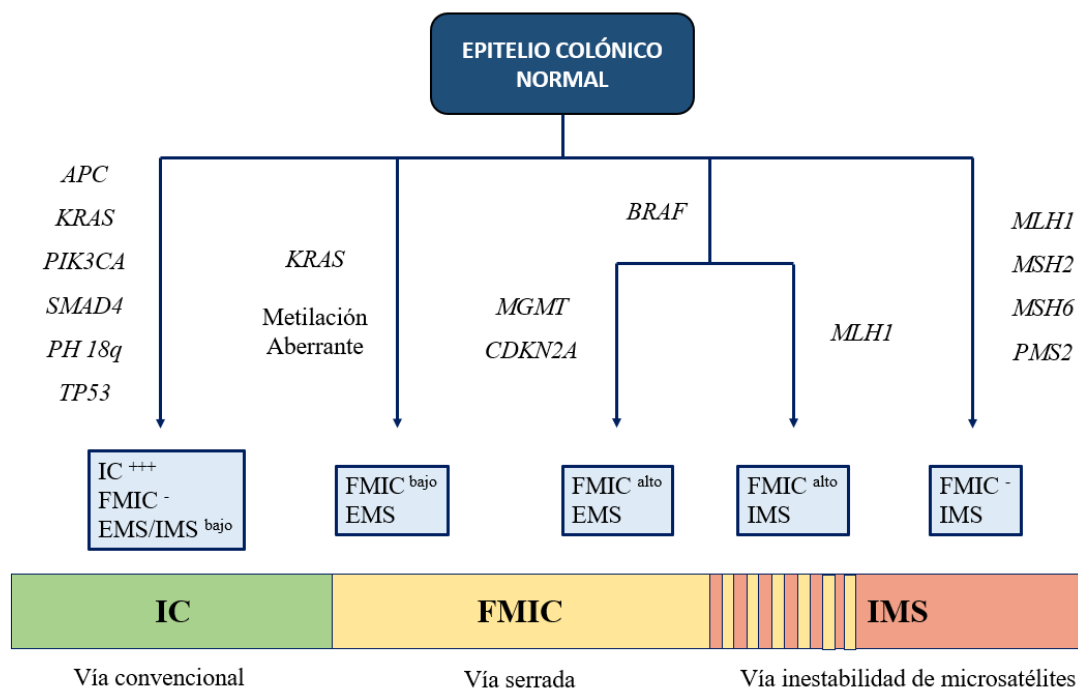


Figura 3. Vías de carcinogénesis en CCR. Abreviaturas: IC: Inestabilidad Cromosómica; FMIC: Fenotipo Metilador de Islas CpG; MSI: Inestabilidad de microsatélites; EMS: Estabilidad de microsatélites; PH 18q: Pérdida Heterogeneidad del brazo largo del cromosoma 18. Adaptado de “*The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer*” (20).

1.2. Proceso de invasión y desarrollo de metástasis hepáticas en cáncer colorrectal

El hígado es la localización metastásica más frecuente en pacientes con CCR, afectando aproximadamente al 70% de los casos y siendo, en la mayoría de las ocasiones, la principal causa de mortalidad. Las metástasis pulmonares se presentan en un 45-50% de los pacientes, mientras que la afectación peritoneal ocurre en el 40-45%, lo que las convierte en la segunda y tercera localización metastásica más común, respectivamente (29).

Tradicionalmente, el desarrollo de metástasis a distancia se consideraba como un evento relativamente tardío en el proceso de progresión tumoral, sin embargo, esta diseminación también puede ocurrir en fases muy iniciales de la formación

del tumor (30). Además, la progresión metastásica no siempre sigue un modelo de diseminación de células individuales o clones (modelo monoclonal); también es posible que se produzca la diseminación simultánea de diferentes células o múltiples clones (modelo policlonal) (31,32). Todos estos aspectos, sintetizados en la figura 4, aumentan la complejidad de la comprensión de los mecanismos implicados en el proceso de invasión y desarrollo de metástasis.



Figura 4. Modelos del proceso de formación de metástasis.

El proceso largo y complejo que siguen las células tumorales desde que abandonan el tumor primario y forman nuevas colonias en tejidos distantes se denomina cascada de invasión y metástasis. En ella participan múltiples vías moleculares y numerosos tipos celulares (33,34). Los mecanismos involucrados en el proceso de invasión y desarrollo de metástasis se revisan a continuación y se resumen en la figura 5.

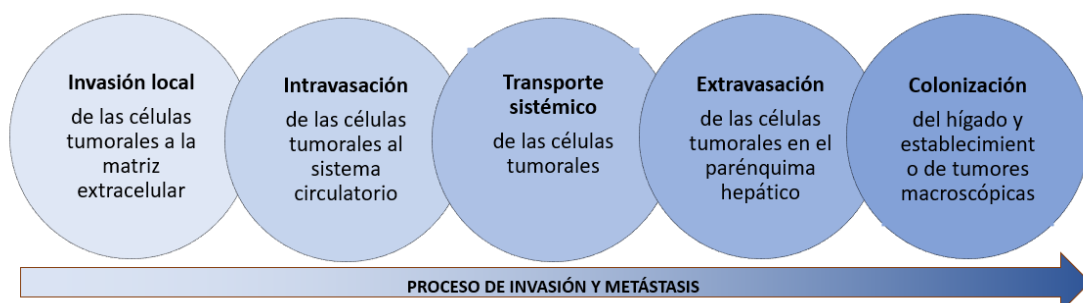


Figura 5. Proceso de invasión y metástasis en el cáncer.

1.2.1. Invasión local de las células tumorales en la matriz extracelular

La carcinogénesis comienza con la transformación de las células normales en células malignas a través de varias alteraciones genéticas y fenotípicas celulares. Aunque el mecanismo inicial de metástasis aún se desconoce, los datos actuales sugieren que la transición epitelio-mesénquima desempeña un papel crucial en esta etapa temprana de propagación al permitir la movilidad y la capacidad de invasión de las células tumorales. La interacción entre el tumor, no solo con los tejidos estromales adyacentes, sino también con el microambiente inmunitario, es un aspecto crucial en el proceso de tumorogénesis y en la respuesta a los tratamientos farmacológicos (35).

Recientemente se ha propuesto un nuevo escenario en el proceso de invasión inicial del tumor y formación de metástasis, con la identificación de una población de células tumorales que presentan un enriquecimiento de los genes asociados con un mal pronóstico y que se denominan HRC (por sus siglas en inglés, *High Relapse Cells*). Estas células, que presentan un alto contenido de la proteína de membrana EMP1, mantienen escasa actividad proliferativa, pero son capaces de desprenderse del tumor primario e iniciar el proceso de formación de metástasis en el órgano a distancia. La importancia de estas células se pone de manifiesto cuando, mediante la ablación genética de las células con alto contenido de EMP1, se confirma una mayor dificultad para desarrollar metástasis hepáticas. Además, en modelos murinos, se ha observado que el tratamiento con inmunoterapia neoadyuvante puede eliminar células metastásicas residuales en las etapas tempranas de la colonización, lo que se traduce en un menor índice de recaída hepática (36).

A pesar de estos últimos avances, los mecanismos específicos asociados al proceso de invasión e inicio del proceso de formación de metástasis aún están por esclarecerse.

1.2.2. Intravasación de las células tumorales en el sistema circulatorio

Una vez que las células malignas se desprenden del tumor primario, el siguiente paso es acceder a los vasos sanguíneos y linfáticos. Esta intravasación les

proporciona un medio para que las células tumorales circulantes se desplacen a distintos órganos, donde tienen la capacidad de formar nuevas colonias (37). Las metástasis hepáticas se originan principalmente a través de la vía hematógena, aunque la diseminación por vía linfática también es posible (38). La circulación sistémica es letal para la gran mayoría de las células tumorales, y solo el 0,01% de ellas acceden al sistema circulatorio y son capaces de desarrollar metástasis (39). Para poder sobrevivir al entorno hostil causado por las fuerzas del torrente circulatorio, así como para evitar los ataques del sistema inmune durante su transporte sistémico, las células tumorales son protegidas mecánicamente y químicamente por plaquetas y neutrófilos, o incluso mediante la formación de émbolos celulares agrupándose entre ellas, protegiéndose también del estrés de cizallamiento (40).

1.2.3. Transporte sistémico de las células tumorales

En el CCR, el organotropismo, o la capacidad de un tumor para metastatizar en un órgano específico, está influido por múltiples factores, siendo uno de los más significativos el sistema circulatorio. Esto se debe a que el drenaje del intestino se vacía directamente en el hígado a través de la vena porta. Así, aunque las células tumorales puedan ser intrínsecamente poco adaptables para la colonización hepática, la gran cantidad de estas células que se acumulan en el hígado favorece la aparición de metástasis en este sitio. Una vez que estas células alcanzan el hígado, el primer contacto se establece con los vasos sinusoides, una red capilar hepática específica con diferentes poblaciones celulares. Las células endoteliales sinusoidales, las células de Kupffer, las células estrelladas hepáticas y las células de Pit, todas ellas desempeñan un papel crucial en la homeostasis hepática y la metástasis del CCR (41).

1.2.4. Extravasación de células tumorales en el parénquima hepático

La colonización y formación de metástasis en el hígado no solo está favorecida por la gran cantidad de células tumorales que llegan a través del sistema circulatorio, sino también depende de eventos de interacción específicos entre las células tumorales y el microambiente del órgano diana. La interacción inicial

de las células tumorales con la respuesta inmunitaria innata hepática es un arma de doble filo. Por un lado, la inflamación causada por la retención de estas células en los vasos sinusoides puede provocar isquemia/reperfusión transitoria, lo que permite la eliminación de algunas de ellas. Sin embargo, esta misma respuesta inflamatoria puede facilitar la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales vasculares y favorecer su migración al espacio de Disse, lo que favorece la colonización (42,43). La arquitectura de las paredes de los vasos sanguíneos y la morfología de las células endoteliales también pueden influir en la facilidad y probabilidad de extravasación hepática, tal y como se expone posteriormente (44).

1.2.5. Colonización del hígado y establecimiento de tumores macroscópicos

Una vez en el hígado, las células tumorales se enfrentan a un microambiente único y complejo. Las células hepáticas, tanto parenquimatosas como no parenquimatosas, junto con las células inflamatorias e inmunitarias reclutadas, juegan un papel en la respuesta a las células tumorales invasoras, pudiendo inhibir o favorecer la progresión metastásica en las diferentes etapas del proceso de colonización. Sin embargo, los factores que determinan el resultado de estos efectos opuestos y el patrón de crecimiento metastásico aún no están completamente comprendidos (43).

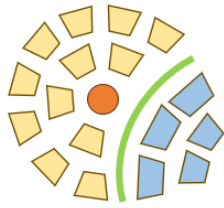
El crecimiento de una célula del tumoral en una colonia metastásica representa la fase final y más mortal de la progresión maligna de un tumor. Incluso las células malignas que han logrado extravasarse parecen estar destinadas casi invariablemente a ser eliminadas del parénquima del tejido o, a veces, a entrar en un estado indolente de latencia en el que persisten durante semanas, meses o incluso años (45–47).

1.3. Características de las metástasis hepáticas en el cáncer colorrectal

1.3.1. Patrones de crecimiento

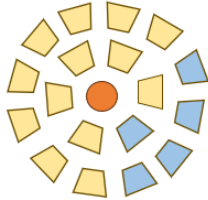
Una vez establecidas, las metástasis hepáticas de CCR pueden crecer desarrollando distintos patrones histológicos, cuyo papel como biomarcadores pronósticos y predictivos ha cobrado creciente relevancia en los últimos años. El patrón desmoplásico, asociado a un pronóstico más favorable, se caracteriza por un anillo de estroma fibroso que separa las células tumorales de los hepatocitos circundantes. En contraste, el patrón de reemplazo, relacionado con un pronóstico desfavorable, implica que las células tumorales invaden y reemplazan a los hepatocitos. Por último, en el patrón de empuje, las placas hepáticas adyacentes a las metástasis aparecen aplanadas debido a la presión del tumor (48,49). La figura 6 resume las características de los patrones de crecimiento más relevantes de las metástasis hepáticas en CCR.

Es interesante mencionar que el patrón de crecimiento de reemplazo no usa la angiogénesis para obtener suministro vascular al tumor, sino que lo realiza mediante un proceso de cooptación de microvasos, un mecanismo para obtener suministro vascular a partir de los vasos sanguíneos normales circundantes sin necesitar realizar el proceso de angiogénesis (50). Este aspecto le confiere una mayor resistencia a la terapia con fármacos antiangiogénicos y, por consiguiente, puede valorarse como un potencial biomarcador negativo de respuesta a estos fármacos utilizados ampliamente en este tipo de enfermedades. Hay que remarcar, no obstante, que aproximadamente dos tercios de los pacientes presentan un patrón de crecimiento mixto y, desafortunadamente, la base biológica de esta heterogeneidad en el patrón de crecimiento dentro del mismo paciente sigue siendo desconocida (48). Sin embargo, estudios recientes indican que los pacientes que no presentan un patrón desmoplásico puro en el 100% de sus metástasis, exhiben un pronóstico similar al de aquellos con un patrón de reemplazo (49). Señalar que recientemente se ha propuesto un cambio en la nomenclatura de estos patrones de crecimiento, sugiriendo que el término 'encapsulado' es más adecuado que 'desmoplásico'; sin embargo, este punto continúa siendo objeto de debate (51).



Patrón de crecimiento DESMOPLÁSICO

- Anillo exterior de estroma fibroso que separa las células tumorales de los hepatocitos circundantes
- Asociado a un mejor pronóstico
- Sensibilidad a fármacos antiangiogénicos



Patrón de crecimiento de REEMPLAZO

- Las células tumorales invaden y reemplazan a los hepatocitos.
- Asociado a un peor pronóstico
- Proceso de cooptación de microvasos: menor sensibilidad a fármacos antiangiogénicos.

Figura 6. Patrones principales de crecimiento histológico de las metástasis hepáticas en CCR. En azul se representan las células tumorales, en amarillo los hepatocitos y en rojo los sinusoides hepáticos. El anillo fibroso está representado mediante la línea de color verde. Adaptado de “*Growth patterns of colorectal cancer liver metastases and their impact on prognosis: a systematic review*” (52).

Existen pocas evidencias sobre las alteraciones moleculares asociadas a estos patrones de crecimiento. Destaca un estudio reciente que evaluó los patrones de crecimiento histopatológico en 225 pacientes con CCRm. Este estudio empleó técnicas de secuenciación de ARN espacial y análisis de célula única con el fin de investigar las diferencias moleculares entre los distintos patrones de crecimiento. Se encontraron alteraciones metabólicas específicas y una activación de la vía de señalización WNT en las células tumorales relacionadas con el fenotipo de cooptación de vasos. El estudio revela que DKK1, antagonista de la vía de señalización WNT, está implicado en la regulación de los patrones de crecimiento histopatológico. Niveles más altos de DKK1 están asociados con el patrón de crecimiento desmoplásico y una menor actividad de la vía de señalización WNT, mientras que los niveles más bajos se asocian con el patrón de crecimiento de reemplazo y una mayor actividad de la vía de señalización WNT. Además, se identificó un subtipo capilar predominantemente expresado en el hígado sano correspondiente a las metástasis asociadas a la angiogénesis, lo que podría servir como nuevo predictor del patrón de crecimiento (53). Estos hallazgos, que necesitan ser confirmados, podrían abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas en el tratamiento de las metástasis hepáticas.

1.3.2. Determinantes organotrópicos

El patrón de metástasis sigue una distribución no aleatoria entre los distintos órganos del organismo, conocida como organotropismo o metástasis específica de órganos (54). El hígado es el sitio más común de metástasis a distancia en todos los tumores sólidos. Los cánceres gastrointestinales, incluido el CCR, drenan a través de la circulación enterohepática, lo que condiciona que la sangre llegue primero al hígado (55). Sin embargo, cada vez hay más evidencia que sugiere que el organotropismo está regulado por otros múltiples factores, como las características intrínsecas del propio tumor, nichos específicos de órganos y la interacción entre las células tumorales y el microambiente del huésped (figura 7). La identificación de asociaciones entre las características genómicas y los patrones específicos de diseminación metastásica es un área de investigación activa, y en los últimos años se han publicado varios estudios relevantes sobre este tema (29,56).

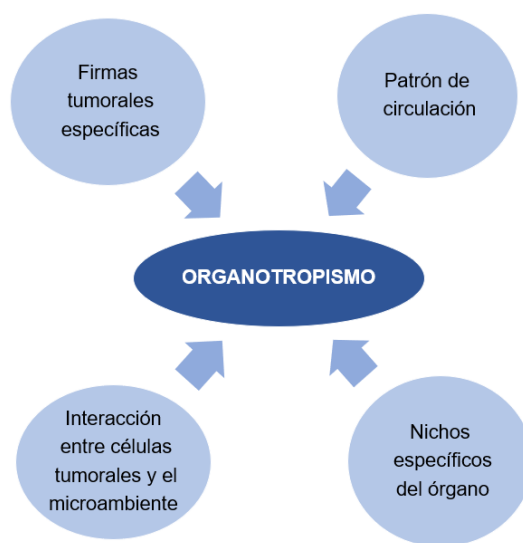


Figura 7. Determinantes organotrópicos de las metástasis hepáticas en CCR.

1.3.2.1. Patrones de circulación

Uno de los aspectos más relevantes que favorece que el cáncer de colon colonice predominantemente el hígado es el hecho de que la sangre mesentérica que drena el intestino fluye a través de la vena porta hacia el hígado. La mayoría

de las células tumorales circulantes derivadas de un tumor intestinal quedan atrapadas en los sinusoides hepáticos e inician la formación de metástasis en el hígado con mucha más frecuencia que en los pulmones, el cerebro o en los huesos (44). Los vasos sinusoides en el hígado y la médula ósea son fenestrados, es decir, revestidos con una capa discontinua de células endoteliales que proporciona una mayor permeabilidad que los vasos sanguíneos en el pulmón u otros órganos, que tienen uniones más estrechas entre las células endoteliales y presentan membrana basal (57). La arquitectura de las paredes de los vasos sanguíneos y la morfología de las células endoteliales también difieren entre los órganos y pueden influir en la facilidad y probabilidad de extravasación y colonización.

1.3.2.2. Firmas tumorales específicas

El patrón de flujo sanguíneo y la retención capilar por sí solos no pueden explicar completamente la distribución no aleatoria de las metástasis entre los distintos órganos. Aunque los riñones y el cerebro reciben aproximadamente el 10-20% del volumen total de sangre del cuerpo, al igual que el hígado, cada órgano muestra un patrón de metástasis muy distinto, independientemente del tipo de tumor primario (58). Esto podría explicarse por la hipótesis de "semilla y suelo", en la que las "semillas" o células tumorales, tienen compatibilidades intrínsecas específicas con los "suelos" u órganos diana (59,60). Por ejemplo, dos histologías diferentes de un mismo órgano pueden generar diferentes patrones de metástasis. Así, el adenocarcinoma de pulmón se propaga con más frecuencia al cerebro y la glándula suprarrenal que el carcinoma escamoso de pulmón (58). De manera similar, las metástasis óseas son el tipo de metástasis más común en los tumores de mama luminales, mientras que el cáncer de mama HER2+ se asocia con una mayor frecuencia de metástasis hepáticas (61–63). En el caso del CCR, el patrón de metástasis también está influido por la histología. Aproximadamente el 85% de los pacientes tienen histología de adenocarcinoma, el 14% presentan carcinomas mucinosos y aproximadamente el 1% carcinomas de células en anillo de sello. Los carcinomas mucinosos son los más propensos a presentar diseminación metastásica en más de un órgano, con una alta incidencia de metástasis peritoneales, fenómeno que también se

observa en los carcinomas de células en anillo de sello (64). Las células tumorales metastásicas, por lo tanto, poseen propiedades celulares intrínsecas seleccionadas para adaptarse a órganos específicos.

Se han identificado características específicas en subpoblaciones de células tumorales que demuestran una mayor capacidad para colonizar diferentes órganos con sus respectivos microambientes específicos (65–67). En general, el cerebro y los pulmones tienen niveles altos de glucosa y oxígeno en comparación con el hígado (68). En el hígado, el estrés metabólico desempeña un papel clave en la colonización metastásica, acompañado de un enriquecimiento en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y el metabolismo. La sobreexpresión de proteínas como c-MET, TIMP-2, IGF-1 y HIF-1 α se ha observado en las metástasis hepáticas del CCR. Este perfil molecular sugiere la existencia de un mecanismo común que favorece la diseminación metastásica hacia órganos específicos, independientemente del tumor de origen (69–71). Las alteraciones epigenéticas también juegan un papel en estos patrones de metástasis. Los genes requeridos para la modificación de la cromatina y la metilación del ADN están frecuentemente mutados en tumores avanzados, lo que destaca la importancia de la modulación epigenética en la formación de metástasis (72).

1.3.2.3. Nichos específicos de órganos y tolerancia inmunológica de las metástasis hepáticas.

Los factores secretados producidos por el tumor primario y las células estromales adyacentes inducen, en órganos distantes, la formación de un microambiente específico que es propicio para la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales una vez llegan a su destino. Estos microambientes se denominan nichos premetastásicos. La formación de nichos premetastásicos se inicia con cambios locales, como la inducción de permeabilidad vascular, la remodelación del estroma y la matriz extracelular, seguida de efectos sistémicos en el sistema inmunológico. La detección temprana de los nichos premetastásicos antes de la evidencia radiográfica de la lesión metastásica sigue siendo un desafío (73,74).

En los últimos años, el papel del hígado en el proceso de diseminación metastásica del CCR ha suscitado un interés creciente. Este órgano no solo actúa como un sitio de localización y formación de metástasis, sino que también desempeña un papel crucial en la respuesta inmunológica a las células tumorales. La tolerancia inmunológica de las metástasis hepáticas puede influir significativamente en la eficacia de los tratamientos, especialmente en el contexto de la inmunoterapia. Se ha observado que los pacientes con metástasis hepáticas de CCR con MSI tratados con pembrolizumab tienen una menor supervivencia en comparación a los pacientes sin metástasis hepáticas. En el estudio Keynote-177 se observó que los pacientes sin metástasis hepáticas tratados en primera línea con pembrolizumab lograron una tasa de respuesta global del 63%, en comparación con el 21% entre los pacientes con metástasis hepáticas. Del mismo modo, la mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) fue menor en aquellos pacientes con metástasis hepáticas, 6 meses, frente a los 34 meses de los pacientes sin metástasis hepáticas (75). Este fenómeno también se observa en diferentes tipos tumorales, independientemente de la inmunogenicidad específica del tumor.

En pacientes con CCR y estabilidad de microsatélites (EMS), la combinación de botensilimab y balstilimab ha mostrado respuestas duraderas y un beneficio en supervivencia global (SG) en un subgrupo tradicionalmente resistente a la inmunoterapia. Con un seguimiento medio de 5,8 meses, el 24% de los pacientes presentó respuesta radiológica objetiva, mientras que el 73% logró control de la enfermedad, con respuestas aún en curso en ocho de los 10 pacientes que inicialmente respondieron al tratamiento (76). También se analizaron los resultados en pacientes sin antecedentes de metástasis hepáticas, incluyendo aquellos con metástasis hepáticas reseadas o tratadas radicalmente mediante técnicas locorregionales como ablación o radiofrecuencia, y sin evidencia de recidiva. En este grupo, se observó una tasa de respuesta objetiva del 42% y una tasa de control de la enfermedad del 96%, ambas superiores a las registradas en pacientes con metástasis hepáticas activas.

Las interacciones entre las células tumorales, el estroma hepático y las células inmunes residentes desempeñan un papel clave en la creación de un estado de tolerancia inmunológica. Los macrófagos hepáticos pueden inducir la pérdida de

células T CD8+ específicas del tumor, facilitando así la evasión inmune de las células cancerosas. Además, las células tumorales liberan citoquinas inmunosupresoras, como IL-6, IL-10 y TGF- β 1, que favorecen un microambiente inmunosupresor y actúan inhibiendo la proliferación y función de las células T efectoras y promoviendo la progresión tumoral (77). Aunque se han identificado estos mecanismos, aún es necesario profundizar en el estudio de los procesos celulares y moleculares que permiten la evasión inmune en el contexto hepático. Comprender mejor estos mecanismos es crucial para desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas que contrarresten la tolerancia inmunológica inducida por el hígado y optimicen la eficacia de la inmunoterapia en pacientes con metástasis hepáticas.

1.3.3. Características moleculares

El CCR es una enfermedad genética y heterogénea desde el punto de vista de la transcriptómica. Durante la última década, la evaluación del estado mutacional de *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* se han convertido en un punto esencial en el manejo de los pacientes con CCRm (78). Las mutaciones en *RAS* ocurren en aproximadamente el 50% de los pacientes y constituyen un factor determinante de resistencia a anticuerpos monoclonales anti-EGFR (79–81). La presencia de la mutación de *BRAF*^{V600E}, que ocurre en el 8-12% de los pacientes, define una población de peor pronóstico y alta tasa de metástasis a nivel ganglionar y peritoneal (82). Otro biomarcador necesario, en este caso para la respuesta a la inmunoterapia, es el estudio de la maquinaria de reparación del ADN o del estado de los microsatélites. La MSI está presente en el 15% de todos los pacientes con CCR en general, y en el 3-5% de los tumores metastásicos en particular (83). Finalmente, otros biomarcadores como amplificaciones de *HER2*, fusiones de *NTRK*, *ALK* o *ROS1*, con una baja incidencia, tienen un creciente interés al disponer de tratamientos dirigidos (84).

Numerosos estudios han evaluado la correlación entre las mutaciones del tumor primario y las metástasis hepáticas. Uno de los estudios más destacados, que analizó las mutaciones de *KRAS* en 305 tumores primarios y sus correspondientes metástasis hepáticas, reveló una tasa de discordancia del

3.6%. (85). Ante dichos hallazgos, las guías sugieren que la determinación de dichas alteraciones moleculares se puede realizar tanto en el tumor primario como en la metástasis hepática (86).

Se han realizado numerosos intentos para clasificar esta enfermedad en grupos biológicamente diferenciados según su patrón de expresión génica y las alteraciones moleculares asociadas. En 2015, a través de un consorcio internacional, se realizó la integración de la información obtenida de los análisis de mutaciones, los cambios en el número de copias, el patrón de metilación, la expresión del microARN y la proteómica de 4.000 pacientes con CCR, consensuándose cuatro subtipos moleculares (87). Este análisis, realizado en tumores primarios, identificó la distribución de los subtipos moleculares CMS. El CMS1 (inmune, 14%) se asocia con hipermutación, MSI y una fuerte infiltración inmunitaria. El CMS2 (canónico, 37%) presenta activación de las vías de WNT y MYC, mientras que el CMS3 (metabólico, 13%) se caracteriza por desregulación metabólica, mutaciones en *KRAS* y baja alteración en el número de copias. Finalmente, el CMS4 (mesenquimal, 23%) muestra una activación prominente del TGF- β , infiltración estromal y angiogénesis. Además de definir las características genéticas del CCR, este consorcio correlacionó los perfiles moleculares con los datos clínico-patológicos y el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, a día de hoy, esta clasificación no se utiliza en la práctica clínica.

Cuando se aplica esta clasificación CMS a las metástasis hepáticas, se observa una discordancia significativa con el perfil molecular del tumor primario. Pitroda y colaboradores reportaron datos del análisis de 324 muestras de metástasis hepáticas, observándose presencia de patrones CMS2 y CMS4 en el 62% y 12% de las metástasis con una notable ausencia de los patrones CMS1 (1%) y CMS3 (0%). Estos resultados eran independientes de si la enfermedad era resecable o irresecable o con las distintas localizaciones tumorales. Además, el 30% de las metástasis hepáticas no se pudieron clasificar según los subtipos del CMS. Este mismo grupo, realizó un análisis propio de expresión de las metástasis hepáticas y, mediante análisis computacional, pudieron establecer 3 subtipos moleculares distintos diferenciados. El subtipo 1 o canónico, presente en el 33% de los casos, con un pronóstico intermedio, tiene poca infiltración inmune y estroma, y se encuentra enriquecida en alteraciones de la vía de *E2F/MYC*. El subtipo 2 o

inmune, presente en el 28% de los casos y con un pronóstico más favorable, tiene una alta infiltración inmune, enriquecimiento por interferón alfa y activación vía de *TP53*. El subtipo 3 o estromal, presente en el 39% de los casos y con un pronóstico desfavorable, se caracteriza por mayor infiltración estromal, angiogénesis y transición epitelio-mesénquima (88,89).

Existen otras propuestas de clasificación molecular de las metástasis hepáticas basadas en el perfil de expresión génica. En otro estudio reciente, orientado a establecer una estratificación molecular en CCRm, se analizaron datos de expresión génica de 170 pacientes tratados quirúrgicamente, junto con 34 líneas celulares y 15 organoides derivados de metástasis hepáticas resecadas. Se encontraron cinco subtipos de metástasis hepáticas distintos, cada uno con características moleculares y clínicas diferentes. El estudio mostró que estos subtipos se correlacionan con la supervivencia y la respuesta al tratamiento. El Subtipo 1 (LMS1), presente en 13-18% de los casos, presenta un fenotipo epitelial con expresión similar a MSI y tumores BRAF, y se asocia a un peor pronóstico. En contraste, el Subtipo 5 (24-32%), de perfil mesenquimal, muestra mayor afectación estromal y una mayor probabilidad de debut metastásico sincrónico (90).

Si bien estos resultados, que se encuentran sintetizados en la tabla 1, pueden proporcionar un marco para futuros estudios relacionados con la clasificación molecular de pacientes con enfermedad metastásica, actualmente no tienen repercusión en la práctica clínica habitual ni en la toma de decisiones terapéuticas.

	Pitroda y col.			Moosavi y col.		
	Subtipo 1 Canónico	Subtipo 2 Immune	Subtipo 3 Estromal	LMS1	LMS2-4	LMS5
Prevalencia	33%	28%	39%	13-18%	55-59%	24-32%
Alteraciones moleculares	NOTCH PIK3C2B	NRAS, CDK12, EBF-1	SMAD3	KRAS TP53	TP53	-
Fenotipo / firmas moleculares	↓ inmune y estroma Señalización de MYC Daño celular	↑ inmune Señalización interferón Vía TP53	↑ Estroma Señalización KRAS TEM y angiogénesis	MSI-Like	Amplificación del tránsito celular	Infiltración inmune y estromal
Características clínicas	Metástasis múltiples órganos	Oligometástasis	Metástasis múltiples órganos	↓ Heterogeneidad tumoral	↑ Heterogeneidad tumoral	Metástasis sincrónicas
Pronóstico.	Intermedio	Favorable	Desfavorable	Muy mal pronóstico	-	-

Tabla 1. Clasificación molecular de las metástasis hepáticas en CCR. Comparativa entre los modelos propuestos por Pitroda y col. y Moosavi y col. Adaptado de *“Integrated molecular subtyping defines a curable oligometastatic state in colorectal liver metastasis”* y *“De novo transcriptomic subtyping of colorectal cancer liver metastases in the context of tumor heterogeneity”* (90,91).

1.3.4. Enfermedad metastásica limitada al hígado.

En general, una vez establecida la afectación metastásica, el pronóstico de los pacientes es desfavorable. A pesar de que en los últimos años se ha logrado incrementar progresivamente la SG de estos pacientes, actualmente situándose alrededor de 36 meses, la SG a 5 años sigue siendo inferior al 15% (92).

El 15-25% de los pacientes presentarán enfermedad hepática sincrónica en el momento del diagnóstico, con presencia de metástasis limitada exclusivamente al hígado en el 70-80% de estos casos (93). Este aspecto es especialmente relevante, ya que los pacientes con enfermedad confinada al hígado pueden beneficiarse de estrategias terapéuticas más allá de los tratamientos sistémicos estándar, lo que no solo influye en su pronóstico, sino que, en algunos casos, podría ofrecer una opción curativa a pesar de tratarse de una enfermedad metastásica. La resección hepática, por ejemplo, que ha experimentado un incremento en su práctica en los últimos años, logra tasas de supervivencia a los 5 y 10 años del 42% y 25%, respectivamente (94,95). Además, en los últimos años, se ha explorado el trasplante de hígado en pacientes con enfermedad limitada al hígado como una nueva opción terapéutica, alcanzando supervivencia

global a 5 años del 60 al 83% en pacientes ultraseleccionados (96–98). Asimismo, existen numerosos tratamientos locorregionales para pacientes oligometastásicos y enfermedad limitada al hígado (99).

La enfermedad metastásica limitada al hígado también influye en el pronóstico de pacientes con CCR irresecable. Un análisis del estudio fase III FIRE-3/AIO KRK0306 evaluó su impacto en pacientes con CCRm *RAS* no mutado, tratados con FOLFIRI más cetuximab o bevacizumab. De 400 pacientes, 133 (33,3%) presentaban enfermedad confinada al hígado, con una SG significativamente mayor frente a aquellos con afectación extrahepática (36,0 vs. 25,4 meses; HR = 0,66; p=0,002). En el análisis multivariante, la enfermedad hepática limitada se identificó como un factor pronóstico independiente, indistintamente de si se hubiera realizado resección hepática o no (100).

1.3.5. Factores pronósticos

La supervivencia de los pacientes con enfermedad hepática limitada al hígado está influida por múltiples factores, incluyendo la biología tumoral, la distribución del tumor, la presencia de enfermedad extrahepática y la respuesta a tratamientos sistémicos, entre otros.

En la enfermedad metastásica irresecable, más allá de la gran importancia que tienen las características moleculares del tumor, hay que destacar que la presencia de metástasis hepáticas se correlaciona generalmente con un peor pronóstico (101,102). Además, tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, la presencia de enfermedad limitada al hígado se asocia a una mejor supervivencia en comparación con aquellos que presentan otras localizaciones metastásicas añadidas (100).

En relación con los factores pronósticos con enfermedad hepática resecable, existen distintas escalas pronósticas que se deben considerar en la práctica clínica habitual. Históricamente, los factores de mal pronóstico establecidos por Fong en 1999 incluyen la presencia de metástasis múltiples, metástasis de dimensiones superiores a 5 cm, metástasis sincrónicas o diagnóstico en un

intervalo inferior a un año, así como la afectación adenopática locorregional (N+) y/o niveles de CEA superiores a 200 ng/mL (103).

Desde entonces, se han desarrollado distintos modelos de puntuación pronóstica para estratificar a los pacientes con enfermedad hepática en diferentes grupos de riesgo y predecir la supervivencia tras la cirugía. Entre ellos, uno de los más destacado es el *Genetic and Morphological evaluation* o GAME score (104,105). El GAME score incorpora un criterio molecular (*KRAS*) y el Tumor Burden Score (TBS), una herramienta que combina el tamaño y número de tumores para evaluar la carga tumoral y su relación con la evolución de la enfermedad. Permite identificar a los pacientes de peor pronóstico, ya que una puntuación de 6-7 se asocia a una supervivencia del 0% a 5 años. Además, ofrece una estratificación más precisa en comparación con el sistema de Fong, mejorando la diferenciación entre pacientes de alto y medio riesgo (106).

Recientemente se ha propuesto por el grupo de René Adam un nuevo modelo de puntuación pronóstica que incluye la edad, el número de lesiones, el diámetro de las lesiones, la localización del tumor primario, la afectación hepática unilobar o bilobar, la presencia de enfermedad extrahepática y la resecabilidad en el momento del diagnóstico. La suma de la puntuación según la presencia o no de estos parámetros permite dividir a los pacientes en cuatro grupos con diferencias estadísticamente significativas de supervivencia global (107).

CRITERIOS DE FONG	GAME score	Modelo R. ADAM
Metástasis múltiples (>1)	Tumor Burden Score	Edad (>60 años)
Diámetro mayor > 5 cm	Mutación de <i>KRAS</i>	Número de lesiones (1-2;3-9;>10)
Sincrónico (< 12m)	Enfermedad extrahepática	Diámetro mayor (> 5cm)
N+	N+	Localización tumor primario
CEA > 200ng/mL	CEA > 20 mg/dL	Afectación hepática bilobar
		Enfermedad extrahepática
		Enfermedad irresecable

Tabla 2. Comparativa entre los principales índices pronósticos quirúrgicos para las metástasis hepáticas de CCR.

Como se observa en la tabla 2, el *GAME score* es el único sistema que considera las características moleculares del tumor, aunque su enfoque se limita exclusivamente a la mutación de *KRAS*. Este aspecto es particularmente relevante en el contexto actual, donde la evaluación molecular de *RAS*, *BRAF* e MSI se recomienda para guiar las decisiones terapéuticas en pacientes con CCRm. Existe, además, abundante evidencia que correlaciona el perfil molecular con el pronóstico también en pacientes con enfermedad resecable.

Las mutaciones de *BRAF* y *RAS* se correlacionan con una peor supervivencia a 5 años tras la realización de una cirugía hepática (105,108). En uno de los mayores estudios en el que se analiza el impacto pronóstico de *KRAS*, se detectó una peor supervivencia en comparación con los pacientes con *KRAS* no mutado, con una SG media de 42.5 meses frente a 26.6 meses a favor de los pacientes no mutados (109). El estudio mostró también que las recurrencias pulmonares son más comunes en pacientes con mutaciones de *KRAS* (110–112). Además, un estudio reciente mostró que los pacientes con mutación en *KRAS* tratados con quimioterapia adyuvante mediante infusión arterial hepática, combinada con quimioterapia sistémica, presentaron una peor supervivencia libre de resección a los 3 años y una mayor tasa de metástasis pulmonares, óseas y cerebrales en comparación con los pacientes sin mutación de *KRAS* (113).

Por otro lado, la mutación de *BRAF* constituye también un factor pronóstico negativo en los pacientes sometidos a cirugía hepática. En un estudio con 292 pacientes, la SG a los 5 años tras una hepatectomía fue del 55% en el global de la población, pero de tan solo 2.1 % en aquellos pacientes con mutación de *BRAF* (114).

Finalmente, hay que destacar la inclusión de los patrones de crecimiento histológico como factor pronóstico en aquellos pacientes ya operados. El *HICAM score* integra la edad y el TNM en el momento del diagnóstico, la puntuación de la carga tumoral (TBS), los niveles de CEA ≥ 20 ng/mL, la resección del tumor primario y los patrones de crecimiento histológico. En este análisis, el patrón de crecimiento desmoplásico/encapsulado se asocia con una mejor SG, con una mediana de 89,3 meses en comparación con 49,3 meses para el patrón de crecimiento no desmoplásico (HR 0,48; $p=0,011$) (115). Si bien este impacto es

significativo, el papel de los patrones de crecimiento histológico aún debe ser validado y evaluado en mayor profundidad.

Actualmente, se están realizando múltiples esfuerzos para caracterizar los patrones de crecimiento histológico (HGP por su siglas en inglés) de manera prequirúrgica mediante radiómica, con el objetivo de optimizar la estratificación de pacientes y la planificación terapéutica

1.3.5.1. Biopsia líquida y metástasis hepáticas

En los últimos años, ha aumentado el interés en el uso del ADN tumoral circulante (ADNtc) como biomarcador pronóstico en pacientes sometidos a cirugía, tanto para enfermedad localizada como tras la resección de metástasis. La determinación de ADNtc puede ser útil para detectar enfermedad mínima residual postquirúrgica.

Se ha observado que los pacientes ADNtc positivos (ADNtc+) después de la cirugía hepática tuvieron una supervivencia libre de recaída de 12.7 meses en comparación con los 27.4 meses de pacientes ADNtc negativos (ADNtc-) (116). En esta misma línea, un estudio reciente observó que, después de la resección de las metástasis hepáticas, los pacientes con ADNtc+ tenían el doble de probabilidad de tener una mutación concomitante que involucraba *RAS* y *TP53*, considerándose como un biomarcador pronóstico significativo (47% frente a 23%). Al año de la hepatectomía, las tasas de recurrencia fueron significativamente más altas en los pacientes ADNtc+ en comparación con los pacientes ADNtc- (94% frente a 49%) (117).

Un metaanálisis reciente evaluó el papel del ADNtc como biomarcador en la selección de pacientes con metástasis hepáticas. Se analizaron 11 estudios, de los cuales 9 fueron incluidos en el metaanálisis. Los resultados mostraron que la presencia de ADNtc+ tras la cirugía se asociaba a un mayor riesgo de recurrencia (HR 3.12; 2.27–4.28, $p < 0.00001$) y menor SG (HR 5.04; 2.53–10.04, $p < 0.00001$). Sin embargo, no se encontró una relación significativa entre el ADNtc prequirúrgico y el riesgo de recurrencia o SG. A pesar de su valor pronóstico, la incorporación del ADNtc en el algoritmo de manejo de las metástasis hepáticas

requiere validación adicional, especialmente en su papel como biomarcador predictivo. En la tabla 3 se resumen los principales estudios que han evaluado su utilidad tras la cirugía hepática. (117–125).

Autor Año	Diseño del estudio	N de pacientes	Tipo de test	NGS/ PCR	Agnóstico Vs Informado	Tiempo extracción	Porcentaje positivo vs negativo	SLR	SG
Newhook et al. 2022	Prospectivo. Unicentro	48	Guardant adaptado (23 genes)	NGS	Agnóstico.	Previo y posterior a la cirugía	ADNtc+/-: 43% ADNtc-/-: 34% ADNtc+/-: 23%	ADNtc +/-: 6m ADNtc -/-: 33m (p=0.001)	ADNtc +/-: 42m ADNtc -/-: NA (p=0.015)
Nishioka et al. 2022	Retrospectivo. Unicentro	105	Panel 70 genes NGS	NGS	Agnóstico	Posterior a la cirugía	ADNtc+: 30% ADNtc-: 70%	SLR al año: ADNtc +: 94% ADNtc -: 49% (p=0.003).	-
Ogaard et al. 2022	Prospectivo. Unicentro	96	Perfil de metilación	ddPCR	Agnóstico	Previo, posterior a la cirugía y seguimiento	ADNtc+: 65% ADNtc-: 35%	SLR al año: ADNtc +: 61.9% ADNtc -: 12.8% (p<0.0001)	-
Bolhuis et al. 2021	Prospectivo. Multicentro	23	KRAS y NRAS análisis	ddPCR	Informado	Antes neoAdy, previo y posterior a la cirugía	ADNtc+: 26% ADNtc-: 74%	ADNtc +: 4.8m ADNtc -: 12.1m (p=0.03)	-
Kobayashi et al. 2021	Prospectivo. Unicentro	40	Guardant3 60®	NGS	Agnóstico	Previo a la cirugía	ADNtc+: 80% ADNtc-: 20%	ADNtc+: 12.5m ADNtc-: NA (p=0.02)	ADNtc+: 78.1m ADNtc-: NA (p=0.14)
Tie et al. 2021	Prospectivo. Multicentro	54	Test personalizado	NGS	Informado	Antes neoAdy, Previo y posterior a la cirugía	ADNtc+: 24% ADNtc-: 76%	SLR a los 5 años: ADNtc+: 16.7% ADNtc-: 63.3% (p<0.001)	SG a los 5 años: ADNtc+: 31.7% ADNtc-: 77.7% (p<0.001)
Wang et al. 2021	Prospectivo. Unicentro	82	ADNtc panel 451 genes NGS	NGS	Agnóstico	Antes neoAdy, Previo y posterior a la cirugía	ADNtc+: 41.4% ADNtc-: 58.6%	ADNtc+: 6.8m ADNtc-: 18.2m (p=0.001)	-
He et al. 2020	Prospectivo. Unicentro	20	Panel Colonicore	NGS	Agnóstico	Previo y posterior a la cirugía	ADNtc+: 20% ADNtc-: 80%	ADNtc+: 5m ADNtc-: NA (p=0.472)	-
Narayan et al. 2019	Prospectivo. Unicentro	60	Mutación APC y TP53	NGS y ddPCR	Informado	Intraoperatorio y posterior a la cirugía	ADNtc+: 67% ADNtc-: 33%	SLR a los 2 años: ADNtc+: 79% ADNtc-: 90% (p<0.02)	-

Tabla 3. Principales estudios sobre el valor pronóstico del ADNtc postquirúrgico en las metástasis hepáticas de CCR. Abreviaturas: NA: No alcanzado.

1.4. Tratamiento de las metástasis hepáticas

El abordaje interdisciplinar dentro de un comité de tumores, con el objetivo de individualizar el manejo diagnóstico y las distintas estrategias terapéuticas, ha demostrado impactar significativamente en los resultados y evolución de los pacientes oncológicos (126). En los pacientes con CCR, este aspecto tiene especial relevancia a la hora de valorar las estrategias óptimas en cada caso, en una enfermedad donde la afectación metastásica puede ser tratada con intención curativa en múltiples ocasiones. A continuación, revisamos las principales opciones de tratamiento para los pacientes con enfermedad metastásica limitada al hígado.

1.4.1. Cirugía

En los años 60 Woodington y Waugh, cirujanos de la Clínica Mayo, publicaron los primeros resultados favorables del tratamiento quirúrgico de las metástasis hepáticas del CCR, enfermedad considerada hasta entonces como incurable (127). Desde entonces y hasta la actualidad, el uso de este abordaje terapéutico se ha incrementado. Como se ha mencionado anteriormente, la cirugía de las metástasis hepáticas en CCR logra actualmente supervivencias a los 5 y 10 años del 42% y 25%, respectivamente, en comparación con menos del 15% logrado con tratamientos sistémicos (92,95). En este sentido, son numerosos los esfuerzos realizados en los últimos años para incrementar el porcentaje de pacientes a los que se les podrá plantear este abordaje terapéutico.

Desde el punto de vista quirúrgico, ha sido clave el cambio en las indicaciones quirúrgicas para las metástasis hepáticas de CCR. Históricamente, los criterios de resecabilidad eran muy estrictos. Estos criterios incluían, entre otros, la presencia de menos de tres metástasis, un tamaño máximo inferior a 5 centímetros, un margen de resección negativo y niveles bajos de CEA preoperatorios. Sin embargo, el tránsito hacia criterios más pragmáticos, que se centran en la posibilidad de resecar completamente todas las metástasis hepáticas dejando al menos un 30% de hígado remanente, ha ampliado considerablemente la población de pacientes elegibles para cirugía (95,128). Este cambio de paradigma ha ido acompañado del desarrollo de nuevos procedimientos quirúrgicos, como la embolización de la vena porta, la ablación por radiofrecuencia combinada con hepatectomía, la hepatectomía en dos tiempos y la partición hepática asociada a ligadura de la vena porta para una hepatectomía escalonada (ALPPS por su siglas en inglés), que han permitido ampliar las indicaciones de la cirugía para pacientes con CCR irreseccable con un impacto positivo en supervivencia (129–137).

Desde el punto de vista oncológico, el avance de la quimioterapia sistémica, con o sin terapias dirigidas, ha permitido poder llevar a cabo una cirugía incluso en pacientes con metástasis hepáticas inicialmente consideradas como irreseccables. Lograr la resecabilidad es fundamental para estos pacientes, ya que el pronóstico es obviamente mucho mejor si las metástasis pueden ser

eliminadas quirúrgicamente en comparación con aquellas que no pueden ser resecadas. El registro internacional LiverMetSurvey, que incluye más de 33.000 pacientes de 326 centros distintos en más de 70 países, ha demostrado que la tasa de supervivencia a 5 años se sitúa alrededor del 32% para los pacientes con enfermedad considerada inicialmente como irresecable, que se convirtió en resecable tras quimioterapia eficaz neoadyuvante (95). Si bien es cierto que este porcentaje es inferior al 46% de supervivencia lograda a 5 años para los pacientes con enfermedad considerada como resecable desde el inicio, sigue siendo muy superior a la supervivencia obtenida en los pacientes que no se pudo realizar un rescate quirúrgico, que en este registro se sitúa por debajo del 10% (95). Así mismo, el planteamiento de una cirugía de metástasis hepáticas no debería ser restringido a un escenario exclusivo de primera línea de tratamiento, ya que se han reportado datos de supervivencia similares en pacientes resecados tras buena respuesta al tratamiento sistémico de segunda línea (138).

Por otra parte, la seguridad de la resección hepática ha mejorado notablemente en las últimas décadas. Hoy en día, la tasa de mortalidad postoperatoria tras las resecciones hepáticas es <5% en centros de experiencia con alto volumen de este tipo de cirugías (139). Estas mejoras han sido paralelas a la mejor comprensión de la anatomía y fisiología hepática, a una mejor selección de los pacientes y los avances en las técnicas quirúrgicas y cuidados perioperatorios.

A pesar de lograr un tratamiento quirúrgico óptimo de las metástasis hepáticas de estos pacientes, hay que considerar que las recurrencias tras la resección inicial de las metástasis hepáticas pueden ocurrir en hasta el 57% de los pacientes, siendo el hígado nuevamente el lugar más común de recurrencia (140). Una segunda cirugía para estos pacientes es una opción factible y segura tal y como han reportado varias series de casos, con tasas de mortalidad perioperatoria inferiores al 5%, y con tasas de supervivencia global a 5 años que oscilan entre el 20 y el 43%, destacando que los pacientes con un intervalo libre de recurrencia de más de un año parecen tener un resultado más favorable (141–145).

1.4.2. Otros tratamientos loco-regionales

En general, los tratamientos loco-regionales de las metástasis hepáticas en CCR se pueden clasificar en dos grandes grupos, tal y como se puede observar en la figura 8. El primero correspondería a los tratamientos ablativos locales, donde se incluyen principalmente la cirugía, así como también la radiofrecuencia y la radioterapia estereotáctica corporal. El segundo grupo aglutinaría a las terapias intraarteriales, incluyendo la radioembolización transarterial, la quimioterapia intraarterial hepática y la quimioembolización transarterial (99).

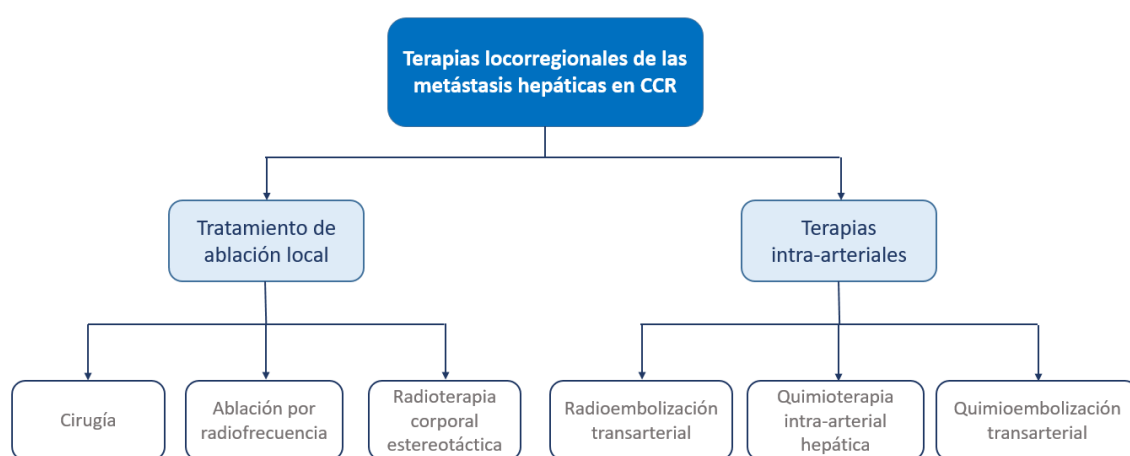


Figura 8. Terapias loco-regionales de las metástasis hepáticas en CCR. Adaptado de “*Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up*” (99).

La integración de tratamientos locales en el manejo del CCRm puede tener distintas indicaciones. En pacientes con enfermedad oligometastásica, pueden ofrecer una opción de erradicación definitiva, especialmente cuando la cirugía no es viable debido a contraindicación o complejidad. En ausencia de ensayos aleatorizados que comparen estrategias quirúrgicas y no quirúrgicas, la ablación térmica y la radioterapia estereotáctica han mostrado altas tasas de erradicación tumoral en lesiones pequeñas, sirviendo como alternativas cuando la cirugía no es posible o resulta demasiado agresiva (146–148).

Además, estos tratamientos pueden retrasar o evitar la necesidad de terapia sistémica, siendo especialmente útiles en tumores de lenta progresión o en pacientes con tolerancia limitada a estos tratamientos. También pueden

emplearse como terapia de consolidación tras un tratamiento sistémico inicial, prolongando el tiempo antes de reintroducir la terapia sistémica.

La elección del tratamiento depende de factores clínicos como la extensión, ubicación y tamaño de las metástasis, así como del estado general del paciente. Sin embargo, la experiencia del centro en cada técnica sigue siendo un criterio determinante en la selección terapéutica (99,149).

1.4.2.1. Ablación térmica

Las técnicas de ablación térmica inducen la muerte de las células tumorales mediante el calentamiento por fricción, lo cual resulta en la carbonización del tejido; o mediante la agitación electromagnética de las moléculas de agua, lo que resulta en necrosis por coagulación. Se aconseja la ablación térmica para pacientes con menos de tres lesiones, cada una de ellas con un diámetro menor de 3 cm y preferiblemente situadas lejos de estructuras vulnerables (150). En ocasiones se ha explorado el uso de la ablación térmica en casos más avanzados con hasta nueve lesiones, cada una con un diámetro menor de 5 cm. En general, se recomienda un margen de ablación de al menos 5 mm alrededor de la lesión para lograr un control local adecuado (151). Entre los estudios más destacados, un ensayo de fase II aleatorizó a 119 pacientes con metástasis hepáticas de CCR a recibir quimioterapia sistémica sola o en combinación con ablación por radiofrecuencia y/o resección quirúrgica. El tratamiento combinado mostró una mediana de SG de 45,3 meses en comparación con 40,5 meses del tratamiento sistémico solo ($p=0,22$) (152).

Recientemente se han reportado los resultados del estudio fase III COLLISION, que comparó directamente la resección hepática de lesiones metastásicas con la termoablación. Este ensayo multicéntrico, aleatorizado y de no inferioridad incluyó a 342 pacientes con enfermedad metastásica exclusivamente hepática, con hasta 10 lesiones de tamaño ≤ 3 cm, cuya resecabilidad o posibilidad de ablación fue evaluada por un comité multidisciplinario de expertos. El objetivo primario de SG mostró medianas similares en ambos grupos, cumpliendo así con la hipótesis de no inferioridad. Notablemente, la tasa de complicaciones

favoreció al grupo de termoablación, con un 82% de pacientes sin eventos adversos, en comparación con el 54% en el grupo quirúrgico. Además, la estancia hospitalaria fue menor con la ablación, y la mortalidad fue del 0%, frente al 2,2% en los pacientes intervenidos quirúrgicamente (153).

Finalmente, destacar que tanto la ablación por radiofrecuencia como la ablación por microondas muestran tasas de éxito técnico, resultados y seguridad comparables en pacientes con metástasis hepáticas de origen colorrectal (154). Sin embargo, la ablación por microondas presenta una ventaja técnica sobre la ablación por radiofrecuencia debido a un efecto de disipación de calor reducido y, por lo tanto, puede ser favorable en metástasis hepáticas que se encuentren cerca de vasos principales (146).

1.4.2.2. Radioterapia estereotáctica corporal

La radioterapia ha desempeñado históricamente un papel secundario en el tratamiento potencialmente curativo de pacientes con metástasis hepáticas debido a la radiotolerancia limitada del hígado y a las altas dosis requeridas para lograr un control local adecuado. La radioterapia estereotáctica corporal es una técnica de radioterapia que permite administrar de manera bien delimitada grandes dosis de radiación en una o pocas fracciones utilizando una guía de imagen y manejo del movimiento (155). Debido a su naturaleza no invasiva y a las altas tasas de control local, se ha convertido en una opción atractiva para pacientes con oligometástasis (148). Los resultados a largo plazo del ensayo clínico aleatorizado fase II SABR-COMET han demostrado una mejora en la SG a los 5 años (17.7% frente al 42.3%; $p=0.006$) con el uso de radioterapia estereotáctica corporal en el manejo de la enfermedad oligometastásica en distintos tipos tumorales, incluido el CCR (156). Un registro prospectivo realizado en Reino Unido mostró que el uso de esta técnica en pacientes con oligometástasis en cualquier localización secundarias a CCR lograba una SG al año y a los dos años del 92% y del 80.3% respectivamente (157).

Aunque no hay ensayos aleatorizados de fase III que evalúen específicamente el uso de la radioterapia estereotáctica corporal en las metástasis hepáticas de CCR, varios estudios prospectivos de fase I y II, junto con series de casos

retrospectivas, han demostrado resultados prometedores en cuanto a la SG, el control local y el perfil de toxicidad (158–160). La SG media en estos estudios se sitúa entre 16 y 32 meses, y la tasa de control local varía del 50% al 95% al año, con resultados más favorables en los años recientes (161). El amplio rango de resultados reportados probablemente se debe a la heterogeneidad de los pacientes incluidos, a las diferentes líneas de tratamiento sistémico utilizadas a lo largo del tiempo y a la variabilidad de la biología tumoral.

1.4.2.3. Radioembolización transarterial (TARE)

La embolización transarterial (TARE, por sus siglas en inglés) con radioisótopos es una técnica intraarterial basada la administración focal de una alta dosis de radiación directamente en las lesiones hepáticas, lo que resulta en necrosis tumoral y fibrosis (162). Generalmente se utilizan microesferas cargadas con el radiador β itrio-90 (^{90}Y), aunque también existen microesferas cargadas con holmio-188 (^{188}Ho) (163). La evidencia de esta estrategia terapéutica se centra en el control de enfermedad hepática en pacientes que no han respondido al tratamiento sistémico o en combinación con quimioterapia en pacientes con enfermedad hepática irresecable (149). Los resultados combinados de los tres ensayos clínicos fase III, SIRFLOX, FOXFIRE y FOXFIRE Global, que evaluaron la efectividad de TARE juntamente con la administración de FOLFOX como tratamiento de primera línea para 1.103 pacientes con metástasis hepáticas de origen colorrectal no tratadas previamente, no mostraron beneficio en SG en comparación con FOLFOX solo, logrando una mediana de SG de 22.6 meses frente a 23.3 meses con quimioterapia sistémica sola ($p=0.61$) (164). Es interesante destacar que, en un análisis posterior de los pacientes incluidos en el estudio SRIFLOX, se observó una mayor tasa de resecabilidad de lesiones hepáticas tras el tratamiento combinado en comparación con la quimioterapia sola (38.1% vs. 28.9%; $p<0.001$) (165). No obstante, se necesitan biomarcadores más robustos para seleccionar mejor a qué pacientes y en qué momento se debe plantear esta opción terapéutica.

Recientemente se han presentado datos de la radioembolización en combinación con quimioterapia en segunda línea de tratamiento. Este estudio fue positivo para los dos objetivos primarios. Se evidenció SLP de 8 meses en el brazo de combinación frente a 7.2 meses en el brazo de quimioterapia sola (HR 0.69; 0.54-0.88, $p=0.003$), así como SLP hepática de 9.1 meses frente a 7.2 meses (HR 0.59; 9.46-0.77, $p<0.0001$) a favor del tratamiento de quimioterapia más radioembolización. No obstante, no se evidenciaron diferencias en SG (166).

1.4.2.4. Quimioterapia intraarterial

La infusión de quimioterapia directamente en la arteria hepática se ha utilizado para aumentar el número de pacientes elegibles para cirugía. En un estudio retrospectivo, 49 pacientes con enfermedad considerada irresecable recibieron infusión de floxuridina en la arteria hepática junto con quimioterapia sistémica FOLFOX o FOLFIRI hasta que la enfermedad fuera resecable o hasta progresión. De los pacientes tratados, 45 mostraron respuestas, con un 8% de respuestas completas y un 84% parciales, lo que permitió que el 47% pudiera someterse a cirugía, cifra que aumentó al 57% entre aquellos que no habían recibido quimioterapia previamente. En este último grupo, la SG fue de 50.8 meses (167). En otro estudio fase II, el 52% de los pacientes (33/64) lograron conversión a resección tras recibir infusión de floxuridina en la arteria hepática combinada con quimioterapia sistémica. La tasa de respuesta global fue del 73%, siendo de hasta el 86% en pacientes sin tratamiento previo. En 25 pacientes resecados, se observó más del 75% de necrosis tumoral en las metástasis. Entre los 31 pacientes no resecados, uno obtuvo respuesta completa, 18 respuestas parciales y 12 enfermedad estable. La conversión a resección se asoció con una SG a 5 años del 63,3%, frente al 12,5% en los no resecados (168).

Otro de los escenarios donde la quimioterapia intraarterial ha demostrado actividad es en el contexto adyuvante tras una cirugía de metástasis hepática. Destaca la serie del Memorial Sloan Kettering Cancer Center, con 2.368 pacientes intervenidos de metástasis hepáticas de CCR que recibieron quimioterapia sistémica y, de los cuales, 785 también recibieron infusión

adyuvante de floxuridina directamente a través de la arteria hepática. A pesar de una carga de enfermedad más alta, los pacientes que recibieron terapia combinada tuvieron una mediana de SG más larga, de 67 meses, en comparación con los 44 meses que presentaron los pacientes que fueron tratados solo con quimioterapia sistémica adyuvante ($p<0,01$) (169). La supervivencia a 10 años fue del 38,0% en el grupo de infusión de la arteria hepática y terapia sistémica en comparación con el 23,8% en el grupo de terapia sistémica sola (170).

Recientemente, dos estudios fase II han evaluado esta estrategia terapéutica. El estudio PACHA-01 analizó su eficacia en pacientes con alto riesgo de recurrencia tras cirugía hepática (>4 metástasis hepáticas). A pesar de una toxicidad aumentada pero manejable, la combinación terapéutica mostró un intervalo libre de recurrencia superior (25 vs. 12 meses; HR 0.598; $p=0.027$) en comparación con quimioterapia adyuvante sola (171). Por otro lado, el estudio HARVEST no confirmó que la intensificación del tratamiento adyuvante con infusión intraarterial hepática de quimioterapia tras la cirugía hepática mejore el intervalo libre de recurrencia. Sin embargo, los pacientes de alto riesgo, aquellos con múltiples metástasis, mutaciones en *RAS* o biopsia líquida positiva tras la cirugía, parecen beneficiarse más de la combinación de quimioterapia intraarterial y tratamiento sistémico (172).

Una de las principales barreras para la implementación global de esta estrategia terapéutica ha sido reunir la experiencia multidisciplinaria adecuada para manejar las complejidades del tratamiento, así como la falta de evidencia de nivel 1 a favor del tratamiento (149).

1.4.2.5. Quimioembolización transarterial

Esta estrategia busca administrar dosis focales elevadas de quimioterapia a las metástasis hepáticas de origen colorrectal, aprovechando su vascularización abundante y reduciendo la exposición sistémica y la toxicidad. Las microesferas con liberación de fármacos cargadas con irinotecán (DEBIRI) permiten una liberación sostenida y controlada del agente quimioterapéutico, superando a la quimioembolización convencional. En los últimos años, han sido objeto de un

creciente interés, con tasas de respuesta promedio del 51-56% y una toxicidad severa en aproximadamente el 10% de los pacientes. Su uso se ha centrado en pacientes con metástasis hepáticas irresecables y/o refractarios a tratamiento sistémico (173).

Los datos sobre la quimioembolización con microesferas cargadas con irinotecán en un contexto neoadyuvante para metástasis hepáticas son limitados. En un estudio con 40 pacientes, tratados un mes antes de la cirugía, se reportó una supervivencia global de 50,9 meses, comparable a la quimioterapia neoadyuvante estándar. El tratamiento fue bien tolerado, sin retrasos quirúrgicos ni toxicidad sistémica relevante, y la mayoría de las metástasis resecadas mostraron una respuesta patológica mayor o completa, similar a la obtenida con quimioterapia sistémica (174). Sin embargo, es necesario mejorar la selección de pacientes y explorar su combinación con otros tratamientos sistémicos.

Terapia	Referencia	n	Características	Resultados	Complicaciones
Radioterapia corporal estereotáctica	Scorsetti et al. 2015	42	Dosis: 75 Gy en 3 Fr	SGm: 29m / CL a 1 año: 95%	Fatiga (55%), elevación transaminasas (25%)
	Herfath et al. 2004	18	Dosis: 14-26 Gy en 1 Fr	SGm: 25m / CL a 1 año: 71%	No toxicidad significativa
	Lee et al. 2009	40	Dosis: 27.7-60 Gy en 5-6 Fr	SGm: 17.6m / CL a 1 año: 71%	Fractura costal (3%), gastritis (2%)
	Rusthoven et al. 2009	15	Dosis: 36-60 Gy en 3 Fr	SGm: 32m / CL a 1 año: 95%	No toxicidad significativa
	Hoyer et al. 2006	44	Dosis 45 Gy en 3 Fr	SGm: 19.2m / CL a 1 año: -	Nauseas (34%), Fallo hepático (2%), muerte (1%)
	Chang et al. 2011	65	Dosis: 22-60 Gy en 1-6 Fr	SGm: - / CL a 1 año: 62%	Toxicidad gastrointestinal (20%)
	McPartlin et al. 2017	60	Dosis: 22.7-62 Gy en 5-6 Fr	SGm: 16m / CL a 1 año: 50%	Nauseas Grado 3 (2%)
Ablación térmica	Sofocleous et al. 2011	56	Dm: 1.9 cm / nm lesiones: 1.4	TE: 94% / SGm: 31m / SLPm 12m	Absceso hepático (2%)
	Solbiati et al. 2012	99	Dm: 2.1 cm / nm lesiones: 2	TE: 93% / SGm: 53.2m	Complicaciones mayores (1.3%)
	Wang et al. 2017	115	Dm: 3.1 cm	SG a los 3 años: 78.7% / Rec. a los 3 ^a : 59.3%	Derrame pleural (4.3%)
	Ruers et al. 2017	119	Dm lesiones: 4-5	SG a los 5 años: 30.3%	Complicaciones postoperatorias 5.9%
	Bonne et al. 2018	193	Dm: 1.7 cm	SG a los 2 años 89% / recurrencia local 28%	Complicaciones mayores (8%)
Radio-embolización transarterial	Hendlisz et al. 2010	44	TARE + 5 FU Vs 5 FU	TPHm 5.5 Vs 2.1 (p<0.05) / SGm 10 vs 7.2 (p=0.8)	Complicaciones G3/4 (5%)
	SIRFLOX 2016	530	TARE + FOLFOX Vs FOLFOX	TPHm 20.5 Vs 12.6 (p<0.002)	Complicaciones G3/4 (85.4%)
	FOXFIRE Global 2017	1103	TARE + FOLFOX Vs FOLFOX	SGm 22.6m Vs 23.3m (p=0.6)	Complicaciones G3/4 (74%)

Tabla 4. Principales estudios con terapias locorregionales para las metástasis hepáticas en CCR. (CL: Control local)

1.4.3. Tratamiento sistémico

Si nos focalizamos en el uso del tratamiento sistémico en pacientes con CCR y afectación limitada al hígado, existen tres posibles escenarios a considerar y que se revisan a continuación.

1.4.3.1. Tratamiento perioperatorio

En pacientes con factores pronósticos muy favorables, como lesiones metacrónicas, menos de tres metástasis, afectación de un solo lóbulo hepático y ausencia de enfermedad extrahepática, el tratamiento sistémico perioperatorio puede no ser necesario. Sin embargo, en casos con criterios menos favorables, como metástasis sincrónicas, más de tres lesiones, afectación bilobar o enfermedad extrahepática limitada, se recomienda considerar quimioterapia perioperatoria (FOLFOX/CAPOX), ya que su uso durante tres meses antes y tres después de la cirugía ha mostrado resultados favorables (175,176).

Dos ensayos clínicos fase III, EORTC 40983 y New EPOC, han evaluado el papel de la quimioterapia perioperatoria. En el estudio EORTC 40983, 364 pacientes con CCR y hasta cuatro metástasis hepáticas resecables fueron asignados a cirugía sola o a seis ciclos de FOLFOX antes y después de la cirugía. La quimioterapia preoperatoria mostró una tasa de respuesta del 43%, pero no se observaron diferencias en la SG a largo plazo. La supervivencia a cinco años fue del 51,2% en el grupo de quimioterapia frente al 47,8% en el grupo de cirugía (175).

Por otro lado, el estudio New EPOC no logró demostrar el beneficio de añadir terapia dirigida contra EGFR al tratamiento perioperatorio. En este estudio, se asignó aleatoriamente a pacientes con tumores sin mutación de *KRAS* en el exón 2 y metástasis hepáticas resecables a recibir quimioterapia con FOLFOX o FOLFIRI con o sin cetuximab antes y después de la resección de las metástasis hepáticas (177). Aunque un mayor número de pacientes respondió al tratamiento con cetuximab, el ensayo fue interrumpido debido a un efecto negativo en la SLP observado en el análisis intermedio. Además, la supervivencia tras la recurrencia

fue significativamente peor en el grupo tratado con cetuximab, lo que sugiere el posible desarrollo de un fenotipo más agresivo o diferencias en los tratamientos recibidos después entre los grupos (178). Solo el 10% de los pacientes que recibieron cetuximab perioperatorio lo volvieron a recibir tras la recurrencia, en comparación con el 30% en el brazo de solo quimioterapia. Los resultados del ensayo New EPOC coinciden con los estudios N0147 y PETACC-8, que no encontraron beneficios al añadir cetuximab a la quimioterapia con oxaliplatino en pacientes con enfermedad en estadio III (179,180).

1.4.3.2. Tratamiento neoadyuvante

La cirugía de metástasis hepáticas de origen colorrectal se asocia con un impacto positivo en la supervivencia a largo plazo, pero solo es viable en el 10% al 20% de los pacientes en el momento del diagnóstico inicial. Sin embargo, el uso de tratamientos sistémicos que logran tasas de respuesta adecuadas ha permitido convertir a pacientes con enfermedad inicialmente irresecable en resecable, aumentando significativamente el número de candidatos a cirugía (181). No obstante, el uso previo y prolongado de quimioterapia puede incrementar el riesgo de toxicidad hepática y morbilidad postoperatoria. El oxaliplatino se asocia con dilatación sinusoidal, mientras que el irinotecán aumenta el riesgo de esteatohepatitis, lo que multiplica por 10 el riesgo de mortalidad tras la cirugía (182).

Se han estudiado múltiples regímenes de quimioterapia para la conversión de las metástasis hepáticas consideradas como irresecables de entrada, pero aún no se ha establecido el régimen de quimioterapia óptimo y debe individualizarse en cada caso. Mayoritariamente, el tratamiento debe incluir quimioterapia de doblete o triplete con o sin terapia dirigida. Se consideran factores para tener en cuenta la necesidad de respuesta, la ubicación del tumor primario, el estado de mutación de *RAS* y/o *BRAF* y las toxicidades relacionadas con la quimioterapia previa. Los dobletes a base de oxaliplatino (FOLFOX/CAPOX) y los dobletes a base de irinotecán (FOLFIRI/CAPIRI) presentan tasas de respuesta similares, entre el 34% y el 59% (183–186). Una adecuada selección de pacientes para la quimioterapia de conversión, valorada dentro de ensayos clínicos de fase II,

mostró que el tratamiento con quimioterapia de doblete logra una tasa de resección R0 de entre el 24% y el 40% (184,186). La intensificación adicional a un régimen de triplete con FOLFOXIRI alcanzó una mayor tasa de respuestas, entre el 60% y el 70%, y una mayor tasa de cirugía R0, del 15% al 26% (187,188).

Se ha investigado el papel de la adición de bevacizumab a la quimioterapia de doblete o triplete en varios ensayos (189–192). Los resultados de un análisis combinado de 11 ensayos que incluyeron a 889 pacientes mostraron que la combinación de FOLFOXIRI-bevacizumab logró una tasa de respuesta del 69% y resección R0 en el 28% de aquellos que inicialmente tenían metástasis irresecables (193). En el estudio OLIVIA, se incluyeron pacientes con enfermedad hepática irresecable y se aleatorizaron para recibir FOLFOX-bevacizumab o FOLFOXIRI-bevacizumab. La tasa de resección fue del 61% para FOLFOXIRI-bevacizumab y del 49% para FOLFOX-bevacizumab. Además, las tasas de respuesta tumoral fueron del 81% en el grupo FOLFOXIRI-bevacizumab y del 62% en el grupo FOLFOX-bevacizumab (192).

La incorporación de agentes anti-EGFR, como cetuximab o panitumumab, al doblete de quimioterapia en pacientes con metástasis hepáticas irresecables produce tasas de respuesta que oscilan entre el 41% y el 70%, lo que se traduce en tasas de resección R0 que varían entre el 27% y el 38% (194–196). En el ensayo CELIM, la adición de cetuximab a FOLFIRI o FOLFOX aumentó significativamente la tasa de resección R0 (25% frente a 7%) en comparación con la quimioterapia sola (197). La combinación de inhibidores de EGFR con triplete de quimioterapia ha mostrado consistentemente mejores respuestas en comparación con solo triplete en pacientes con tumores sin mutación de *RAS* (198,199). El brazo que recibió terapia cuádruple logró una tasa de respuesta del 86%, mientras que aquellos que recibieron terapia de triplete tuvieron una tasa de respuesta del 54%. Entre aquellos que recibieron panitumumab, las respuestas fueron significativamente mayores en pacientes con tumores del lado izquierdo en comparación con aquellos con tumores del lado derecho (90% frente a 60%) (199).

En un análisis combinado de seis ensayos clínicos, se observaron mejoras significativas en la SLP y la SG con la adición de cetuximab o panitumumab a la

quimioterapia solo en pacientes con tumores sin mutación de *RAS* y con tumor primario localizado en el lado izquierdo. Por otro lado, para pacientes con tumores primarios del lado derecho, más agresivos, la adición de bevacizumab a la quimioterapia puede ser más beneficiosa (200).

1.4.3.3. Tratamiento adyuvante

El uso de quimioterapia adyuvante tras la cirugía hepática en CCRm sigue siendo un tema controvertido. Aunque su objetivo es erradicar micrometástasis residuales, hasta la fecha no se ha demostrado un beneficio claro en términos de SG (201,202). Un estudio prospectivo de fase III con 300 pacientes comparó la hepatectomía sola con la hepatectomía seguida de quimioterapia, pero el ensayo fue interrumpido prematuramente por la falta de beneficio en la SG. La tasa de supervivencia a cinco años fue del 83.0% en el grupo de control frente al 69.5% en los pacientes que recibieron quimioterapia. Sin embargo, la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fue del 38.7% para la hepatectomía sola en comparación con el 49.8% para la hepatectomía seguida de quimioterapia (HR, 0.67; P= 0.006) (203). Aunque los mecanismos detrás de estos hallazgos no están claros, una posible explicación es el uso de oxaliplatino en la enfermedad recurrente, que podría haber afectado negativamente la eficacia del tratamiento. Además, en pacientes que recibieron quimioterapia postoperatoria, se ha observado que pueden surgir tumores más agresivos y resistentes a la quimioterapia en el momento de la recaída. Estos factores podrían explicar la diferencia en la supervivencia entre los grupos de tratamiento. Dado que aún no se ha demostrado un impacto positivo en la supervivencia global, se requieren estudios adicionales y una mejor selección de pacientes antes de considerar una recomendación universal para su uso en este contexto.

1.4.4. Trasplante hepático

El trasplante hepático se considera una opción terapéutica en ciertos tumores, como el carcinoma hepatocelular, el colangiocarcinoma hiliar y en algunos tumores neuroendocrinos de bajo grado. Sin embargo, su uso en el tratamiento

de las metástasis hepáticas del CCR es un tema de intenso debate en la actualidad (98,204,205).

Los primeros intentos de trasplante hepático se llevaron a cabo en la década de los 80 mediante realización de ensayos monocéntricos con tamaño muestral bajo y con inclusión de una población heterogénea. Los malos resultados evidenciados, con una mediana de supervivencia global a 5 años del 18%, una mortalidad perioperatoria de hasta el 30%, así como las altas tasas de recidiva tumoral y la escasez de donantes, condicionaron el abandono de esta estrategia terapéutica (206,207).

Aprovechando los avances en técnicas quirúrgicas y fármacos inmunosupresores que han llevado a una mejora significativa en pacientes sometidos a un trasplante de hígado, un grupo noruego diseñó un nuevo ensayo clínico para evaluar el impacto del trasplante de hígado en pacientes con CCRm con enfermedad limitada al hígado. El estudio SECA-I incluyó 21 pacientes que se sometieron a un trasplante de hígado (96). Al inicio del estudio, el 57% de los pacientes había recibido ≥ 2 líneas de quimioterapia, el 38% presentaba más de 10 metástasis hepáticas y el 76% tenía un Fong score de 3-5. Las tasas de supervivencia a 1 y 5 años fueron del 95% y 60%, respectivamente, con una supervivencia libre de enfermedad del 35% al año. El ensayo SECA destacó por su alta supervivencia a 5 años y por la identificación de factores pronósticos clave, como el diámetro tumoral ≥ 5.5 cm, el intervalo < 2 años desde la resección del tumor primario, niveles de CEA > 80 ng/mL y progresión de la enfermedad al trasplante. Con estos factores, se establecieron tres subgrupos pronósticos, dando lugar al puntaje de Oslo, resumido en la figura 9.

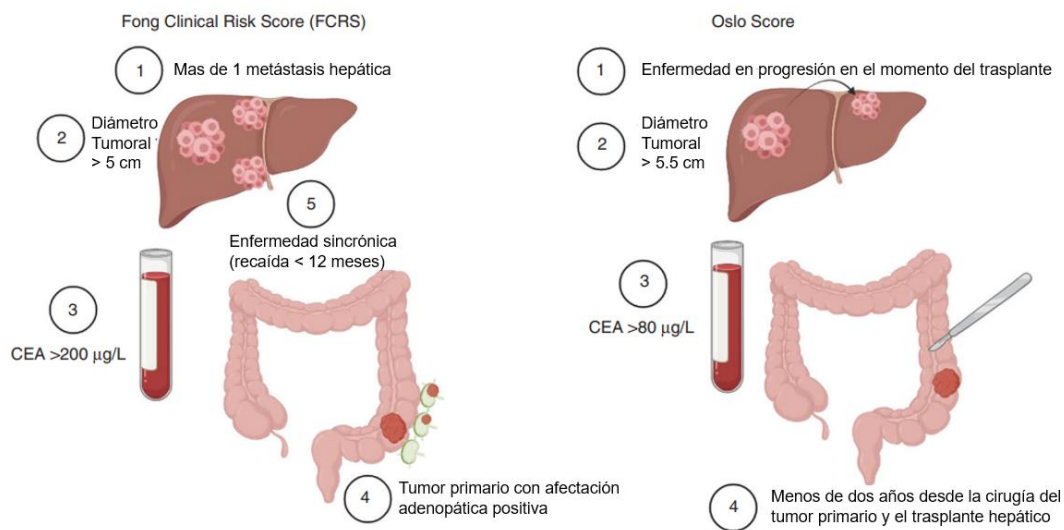


Figura 9. Comparación entre los índices pronósticos de Fong y de Oslo. Adaptado de “Liver transplantation in metastatic colorectal cancer: are we ready for it?” (98)

Es relevante mencionar el patrón de recaídas de los pacientes en este estudio tras el trasplante. La localización más común de las recaídas fue en los pulmones (80%), seguida del hígado trasplantado (33%). Un 38% de los pacientes con recurrencia post-trasplante era elegible para cirugía o tratamiento con radiofrecuencia, y no se registraron fallecimientos atribuibles a complicaciones quirúrgicas. A pesar de la alta tasa de supervivencia a 5 años, que era del 60%, se deben considerar algunas limitaciones del estudio, como el tamaño reducido de la muestra, la elevada tasa de recurrencia y la breve supervivencia libre de enfermedad.

El estudio SECA-II, también realizado por el grupo noruego, fue un ensayo prospectivo que incluyó 15 pacientes con CCRm con enfermedad limitada al hígado no resecable y tuvo criterios de selección más restrictivos que el estudio SECA-I (97). Las características iniciales de los pacientes mostraron que el 47% de los pacientes incluidos habían recibido quimioterapia de primera línea, y solo uno presentaba mutación en *KRAS*. Con un seguimiento medio de 36 meses, las tasas de supervivencia a 1, 3 y 5 años fueron del 100%, 83% y 83%, respectivamente, mientras que la SLP en este mismo intervalo de tiempo fue del 53%, 44% y 35%, con una mediana de 13,7 meses. Seis de los 8 pacientes con recidiva desarrollaron metástasis pulmonares, de los cuales 5 fueron resecados quirúrgicamente. Al final del seguimiento, 11 pacientes no presentaban evidencia

de enfermedad. En comparación con el SECA-I, los pacientes del SECA-II no presentaban progresión de la enfermedad ni niveles de CEA >80 µg/L en el momento del trasplante. Además, los pacientes del SECA-I presentaban un puntaje de Oslo más alto, mayor número y tamaño de lesiones hepáticas, niveles más elevados de CEA y un SUVmax más alto en PET-CT, sugiriendo que una selección más rigurosa de los pacientes podría mejorar la supervivencia.

El estudio TRANSMET, con resultados publicados recientemente, ha reavivado el debate sobre el papel del trasplante hepático en pacientes con CCR estadio IV exclusivamente hepático y lesiones irresecables. Este estudio compara la combinación de trasplante hepático y tratamiento antineoplásico con quimioterapia y terapia dirigida. Los criterios de inclusión son estrictos, abarcando pacientes de hasta 65 años, con un ECOG de 0-1 y confirmación de irresecabilidad, entre otros requisitos. El objetivo primario era la SG a 5 años. Tras 59 meses de seguimiento, la SG a 5 años fue del 57% en el grupo trasplantado frente al 13% en el grupo control, con un HR de 0.37 (p=0.0003). En el análisis por protocolo, la diferencia fue más marcada, con SG de 73% frente a 9% (HR 0.16). La tasa de recurrencia en el grupo experimental fue del 72% a 5 años, siendo el pulmón el órgano más frecuentemente afectado. Un 46% de los pacientes fueron rescatados quirúrgicamente o mediante ablación, con un 42% libre de enfermedad al final del seguimiento (208).

Estos datos, junto con el creciente número de estudios en curso a nivel mundial posicionan el trasplante hepático como una estrategia relevante en el manejo de pacientes con CCRm. No obstante, el éxito de esta estrategia dependerá, en buena medida, de una adecuada selección de los pacientes candidatos.

1.5. Enfermedad hepática permanentemente limitada al hígado.

Uno de los aspectos más notables en pacientes que inician su trayectoria con enfermedad hepática limitada al hígado es que una parte de ellos mantendrá esta condición a lo largo de todo su proceso oncológico. Aunque este fenómeno es relativamente frecuente en nuestra práctica clínica, se encuentra escasamente documentado en la literatura.

Un análisis reciente mostró que el 20-25% de los pacientes con enfermedad hepática irresecable continúan con enfermedad permanentemente confinada al hígado durante toda su evolución, mientras que el 77% desarrolla progresión extrahepática, principalmente en los primeros 3 años tras el diagnóstico (15% el primer año, 49% el segundo año y 66% el tercer año). A pesar de la irresecabilidad inicial de los pacientes incluidos en el estudio, el 73% de los pacientes fueron finalmente resecados tras tratamiento sistémico y el 33% recibieron tratamiento locorregional. La edad >70 años, afectación ganglionar locorregional y ≥ 4 metástasis hepáticas se asociaron con mayor riesgo de progresión extrahepática, mientras que la resección hepática mostró un efecto protector (SHR 0.43; $p=0.001$). En el análisis multivariable, solo el número de metástasis hepáticas (SHR 1.63; $p=0.01$) y la resección hepática se mantuvieron como factores pronósticos. No se encontró asociación entre *RAS*, *BRAF* o MSI y la progresión extrahepática (209).

Recientemente, se han reportado datos sobre este fenómeno de enfermedad permanentemente limitada al hígado en pacientes con enfermedad resecada dentro de registro de LiverMetSurvey. Se analizaron un total de 8.715 pacientes que presentaron recurrencia tras una primera cirugía hepática. De ellos, el 16% experimentó enfermedad limitada al hígado persistente, mientras que el 84% desarrolló recaídas extrahepáticas. El análisis multivariante identificó varios factores predictivos de enfermedad extrahepática, entre los cuales se incluyen el tumor del lado derecho (HR 0.82), la afectación unilateral del hígado (HR 0.74) y un diámetro de la lesión mayor a 3 cm (HR 0.85). Además, las metástasis sincrónicas y el sexo masculino se asociaron con la persistencia de la enfermedad limitada al hígado con HR de 1.29 y 1.15, respectivamente. Sin embargo, no se reportaron datos sobre el papel de la biología molecular, como *RAS*, *BRAF* o MSI (210).

Aunque estos datos requieren validación, respaldan la existencia de un subgrupo bien definido de pacientes con enfermedad permanentemente limitada al hígado, cuya frecuencia y comportamiento clínico justifican su reconocimiento como una categoría específica dentro del CCRm.

2. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

El CCR es un problema de salud pública a nivel mundial y el tipo de cáncer más frecuente en nuestro país (5). El hígado es el principal órgano de metastatización, con un 15-25% de los pacientes presentando enfermedad hepática sincrónica al diagnóstico, de los cuales el 70-80% tiene afectación exclusiva del hígado (93). Además, entre el 30-40% de los pacientes diagnosticados en estadios localizados sufrirá recaídas, siendo el hígado el órgano más afectado (11–13). Un subgrupo específico, aproximadamente el 20% de los pacientes con CCRm, mantendrá la enfermedad confinada al hígado durante toda su evolución, una condición poco estudiada hasta la fecha (209).

El manejo de pacientes con enfermedad limitada al hígado, ya sea resecable o potencialmente resecable, representa un verdadero desafío en la práctica clínica diaria. Para estos pacientes, existen distintos abordajes terapéuticos que no solo tendrán un impacto pronóstico importante, sino que puede lograr la curación en algunos casos. La resección hepática logra tasas de supervivencia a 5 y 10 años del 42% y 25%, respectivamente, en comparación con una tasa de SG a 5 años de menos del 15% con el tratamiento sistémico en los pacientes con enfermedad no resecable (92,95).

En los últimos años el trasplante hepático ha emergido como una potencial nueva opción de tratamiento, con una SG a los 5 años del 60-83% (96,97). No obstante, este procedimiento solo pudo realizarse en un 1-2% de los pacientes evaluados en el estudio SECA, de acuerdo con los criterios actuales para el trasplante hepático. Si extrapolamos estos datos, esto implicaría que únicamente entre 0.24 y 0.51 pacientes con CCR por millón de habitantes al año serían candidatos a esta intervención (211).

Recientemente, el impacto de las metástasis hepáticas en la eficacia de la inmunoterapia ha despertado un creciente interés, ya que su presencia se ha asociado con una menor respuesta a estos tratamientos. Se ha propuesto que el microambiente inmunosupresor hepático reduce la actividad de las células T CD8+, afectando la respuesta inmune sistémica. Este fenómeno ha reavivado el

interés en la identificación de los determinantes que influyen en la presencia o ausencia de metástasis hepáticas (75).

Es importante destacar que el patrón de diseminación metastásica en CCR no es aleatorio, sino que sigue principios de organotropismo, un fenómeno determinado por la interacción de múltiples factores (54). Su comprensión sigue siendo limitada debido a la complejidad del proceso y a la fragmentación en su estudio (212). Recientemente, se han identificado determinantes clave del organotropismo hepático, incluyendo la circulación enterohepática, características intrínsecas del tumor, la presencia de nichos específicos en órganos diana y la interacción entre células tumorales y el microambiente del huésped. Paralelamente, los avances en NGS han permitido la generación de un volumen sin precedentes de datos mutacionales, proporcionando nuevas oportunidades para la identificación de patrones moleculares específicos asociados a este organotropismo.

En este contexto, la identificación temprana del patrón de distribución metastásica, ya sea por la ausencia de metástasis hepáticas o por la presencia de enfermedad permanentemente limitada al hígado, permitiría anticipar la evolución de la enfermedad y optimizar la selección de los tratamientos disponibles, con un impacto positivo en la supervivencia de estos pacientes (figura 10) (213).

Con toda esta evidencia, se plantea la hipótesis de que los pacientes con CCRm y enfermedad permanentemente limitada al hígado presentan características tumorales intrínsecas diferenciadas de aquellos con diseminación extrahepática. El objetivo es utilizar la información clínica y molecular disponible, generada en los últimos años, para caracterizar este subgrupo con distintas perspectivas. Con ello, se busca identificar potenciales biomarcadores específicos que permitan predecir con precisión el patrón metastásico al que la enfermedad está destinada y facilitar el desarrollo de estrategias terapéuticas adaptadas a cada escenario previsto, lo que supondría un cambio de paradigma en el abordaje actual de esta enfermedad.

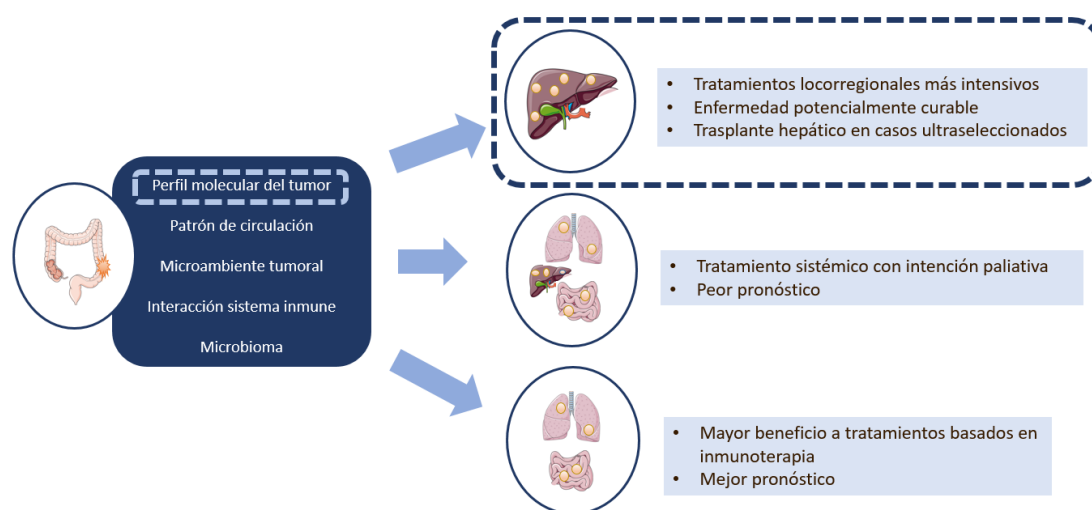


Figura 10. Factores organotrópicos de los patrones metastásicos en CCR y enfoques terapéuticos potenciales según el patrón de diseminación. Adaptado de “*Determinants of Metastatic Colorectal Cancer With Permanent Liver Limited Disease*” (213).

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis primaria

El patrón de metástasis en el CCR no se distribuye aleatoriamente entre los distintos órganos, sino que sigue un fenómeno de organotropismo influido por múltiples factores. Entre ellos, las características intrínsecas del tumor y el microambiente tumoral desempeñan un papel clave. Se plantea la hipótesis de que los pacientes con CCRm con enfermedad permanentemente hepática presentan características tumorales intrínsecas diferenciadas de aquellos que desarrollan metástasis extrahepáticas.

3.2. Hipótesis secundarias

1. Las características clínico-patológicas de los pacientes con CCR pueden desempeñar un papel predictivo en la diseminación metastásica, permitiendo identificar a aquellos con enfermedad permanentemente limitada al hígado.
2. El perfil molecular del CCRm varía en función del patrón de diseminación, presentando diferencias intrínsecas entre los tumores con afectación exclusivamente hepática y aquellos con metástasis extrahepáticas.
3. El microambiente inmunitario asociado al tumor influye en el patrón de diseminación metastásica en el CCR, pudiendo contribuir a la diferenciación entre enfermedad hepática limitada y enfermedad extrahepática.
4. El patrón de diseminación metastásica en el CCR puede tener un impacto significativo en la supervivencia de los pacientes.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo primario

Caracterizar los pacientes con CCRm en función de su patrón de diseminación metastásica e identificar las características específicas de aquellos con enfermedad permanentemente limitada al hígado.

4.2. Objetivos secundarios

1. Determinar la relación entre las características clínico-patológicas de los pacientes con CCRm y su patrón de diseminación metastásica, con el objetivo de identificar factores predictivos de la enfermedad permanentemente limitada al hígado.
2. Analizar el perfil molecular de los tumores de pacientes con CCRm para identificar diferencias específicas entre aquellos con afectación exclusivamente hepática y aquellos con metástasis extrahepáticas.
3. Caracterizar el contexto inmunitario asociado al tumor en pacientes con CCRm y evaluar su influencia en el patrón de diseminación metastásica, con especial énfasis en las diferencias entre la enfermedad exclusivamente hepática y la presencia de metástasis extrahepáticas.
4. Evaluar el impacto del patrón de diseminación metastásica en la supervivencia de los pacientes con CCRm.

5. MÉTODOS

5. MÉTODOS

5.1. Tipo de estudio

Este estudio es de carácter observacional y retrospectivo, centrado en una cohorte de pacientes con CCR con enfermedad metastásica irresecable. Para el análisis, se seleccionaron aquellos pacientes atendidos en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Vall de Hebrón (Barcelona) que cumplieran con los criterios de inclusión detallados en el siguiente apartado. La utilización de los datos clínicos anonimizados de los pacientes y la realización de estudios moleculares se efectuaron tras la firma de los consentimientos informados, aprobados previamente por el comité de ética de investigación clínica correspondientes (PR(AG)309-2022).

5.2. Selección de la cohorte de estudio y criterios de inclusión

Población: La población del estudio incluye pacientes con CCRm irresecable, diagnosticados en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Vall de Hebrón (Barcelona) entre el 1 de enero de 2010 y el 31 de diciembre de 2019. Del total de la población de estudio, los pacientes se dividieron en tres grupos distintos según el patrón de distribución metastásica presentado a lo largo de su enfermedad: aquellos con enfermedad exclusivamente hepática durante toda la evolución de su enfermedad (Grupo A), pacientes con afectación tanto hepática como extrahepática (Grupo B), y pacientes con enfermedad exclusivamente extrahepática (Grupo C) (figura 11). Los pacientes del Grupo A fueron definidos como aquellos con metástasis limitadas al hígado desde el inicio de la enfermedad metastásica hasta su fallecimiento. Por el contrario, el Grupo C incluyó pacientes que presentaron únicamente metástasis extrahepáticas desde el diagnóstico metastásico hasta su fallecimiento, sin presentar enfermedad hepática en ningún momento. El Grupo B incluyó pacientes con afectación hepática y extrahepática en cualquier momento de la evolución metastásica, independientemente del sitio de la metástasis inicial.

Para asegurar la inclusión precisa en las cohortes analizadas, se estableció un seguimiento mínimo de tres años de enfermedad metastásica en los pacientes vivos al momento del corte de datos. Se excluyeron aquellos pacientes con mutación *BRAF*^{V600E} y/o MSI, ya que estos subgrupos constituyen entidades moleculares diferenciadas, asociadas a un proceso de carcinogénesis distinto y a una diseminación metastásica predominantemente peritoneal.

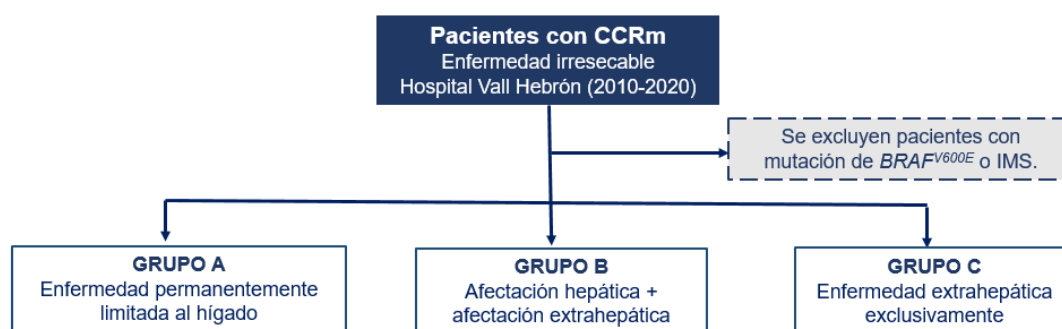


Figura 11. Diagrama de flujo de la población en estudio y de las cohortes incluidas en el análisis.

5.3. Variables clínicas, patológicas y moleculares del estudio

Las siguientes variables han sido recogidas y trasladadas a una base de datos para el análisis en ambas poblaciones.

- Datos epidemiológicos: fecha de nacimiento, edad, sexo (hombre/mujer).
- Datos clínico-patológicos: fecha diagnóstico del CCR, estadiaje al diagnóstico según criterios TNM (estadios I, II, III, IV), cirugía del tumor primario (sí/no), realización tratamiento adyuvante (si aplica), localización del tumor primario (colon derecho: desde ciego hasta flexura esplénica; colon izquierdo: colon descendente y sigma; recto), fecha diagnóstico localización metastásica, localizaciones metastásicas (hepática, extrahepática), enfermedad metastásica sincrónica (sí/no). La enfermedad se considera sincrónica cuando las metástasis se detectan simultáneamente o dentro de los primeros 6 meses desde el diagnóstico del tumor primario, mientras que se define como metacrónica cuando las metástasis aparecen más de 6 meses después de dicho diagnóstico.

- Datos sobre el tratamiento realizado: tratamiento realizado, fecha inicio, fecha finalización, respuesta al tratamiento según facultativos responsable considerando el RECIST 1.1 (214).
- Datos moleculares: resultados mutación de *RAS* (sí/no), resultados mutación de *BRAF^{V600E}* (sí/no), resultados de la MSI (sí/no), VIGex (*Hot/Intermate/Cold*), Para el análisis de genes, se emplearon los paneles Amplicon Hplex y VHIO card-300, cuyos detalles específicos pueden consultarse en el Anexo 1. Así mismo, los genes evaluados mediante secuenciación de ARN en el marco del VIGex también se encuentran listados en el Anexo 1.
- Datos de supervivencia: se recoge fecha de fallecimiento y/o fecha de último seguimiento. Se define supervivencia global (SG) como el tiempo entre diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta fallecimiento o pérdida de seguimiento.

5.4. Análisis de los parámetros moleculares del estudio

5.4.1. Análisis molecular de *RAS*, *BRAF^{V600E}* y MSI

La determinación de la mutación de *RAS* y *BRAF^{V600E}* fue realizada en tejido tumoral en el contexto de la práctica clínica habitual usando métodos de PCR en tiempo real (215). La determinación de mutaciones requiere la extracción y purificación de ADN de tejido tumoral, seguida de la amplificación de una región específica mediante PCR en tiempo real. La detección se realiza con sondas de ADN marcadas con fluoróforos. En este estudio, las mutaciones en *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* se evaluaron mediante los kits "Idylla *KRAS* Mutation Test" e "Idylla *NRAS-BRAF* Mutation Test", que permiten detectar mutaciones en los codones 12, 13, 58, 59, 61, 117 y 146 de *KRAS* y *NRAS*, y en el codón 600 de *BRAF*, con una sensibilidad de hasta un 5% de alelos mutados.

El fenotipo de MSI o deficiencia en el sistema de reparación de apareamiento erróneo (MMR) se evaluó mediante inmunohistoquímica y/o PCR. Para la inmunohistoquímica se emplearon anticuerpos específicos de PharMingen Biosciences dirigidos a MSH2 (clon G219-1129), MLH1 (clon G168-728), MSH6 (clon 44) y PMS2 (clon A16-A). La PCR se realizó utilizando el kit de QIAGEN.

El diagnóstico del fenotipo MSI/MMR se estableció de acuerdo con las guías de la ESMO, considerando como criterio diagnóstico la pérdida de expresión nuclear de al menos una de las cuatro proteínas en el análisis inmunohistoquímico y la inestabilidad en al menos dos de cinco microsatélites analizados mediante PCR (216).

5.4.2. Análisis del perfil molecular ampliado mediante Amplicon Hplex, Panel VHIO card-300 y VIGex.

Amplicon Hplex

El panel personalizado fue diseñado por el Grupo de Genómica del Cáncer del VHIO para el análisis genómico de ADN tumoral en muestras parafinadas, empleando NGS para la detección simultánea de múltiples alteraciones genéticas relevantes en cáncer. El análisis, realizado mediante Illumina MiSeq, se basa en la amplificación específica de regiones diana del ADN utilizando un panel optimizado de 60 genes (ver Anexo 1), permitiendo identificar mutaciones somáticas, pequeñas inserciones y deleciones (indels), así como otras alteraciones genómicas. Las lecturas obtenidas se alinearon (BWA v0.7.12, Samtools v1.2), se recalibraron las bases y se realinearon los indels (GATK v3.4.0), y las variantes fueron identificadas con VarScan2 (v2.3.7). Para validar una mutación, se exigió un mínimo de 7 lecturas que respaldaran el alelo variante. Las variantes de un solo nucleótido frecuentes en la población se filtraron mediante la base de datos 1000g (FAM>0.005), calculándose también la cobertura promedio de la muestra, es decir, el número promedio de lecturas que representan cada nucleótido en el panel. Finalmente, las variantes fueron sometidas a una revisión manual.

VHIO card-300

Este panel, desarrollado como evolución del anterior por el Grupo de Genómica del Cáncer del VHIO en 2017, analiza hasta 430 genes (ver Anexo 1). Para su análisis, se extrajo ADN de muestras tumorales fijadas en formol e incluidas en parafina utilizando el kit Maxwell® RSC FFPE Plus DNA (Promega). La captura

de genes se realizó mediante sondas de enriquecimiento SureSelect XT (Agilent), y la biblioteca generada fue secuenciada con la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina (carrera 2 x 151 PE). Las lecturas obtenidas se alinearon (BWA v0.7.17, Samtools v1.9) contra el genoma de referencia hg19, recalibrando las bases y realineando los indels (GATK v3.7.0, abra2 v2.23), y las variantes se identificaron con VarScan2 (v2.4.3) y Mutect2 (v4.1.0.0). Se consideraron únicamente mutaciones con un mínimo de 5 lecturas del alelo variante, logrando una sensibilidad del 10% de FAM para variantes de un solo nucleótido e inserciones/deleciones. Los polimorfismos de nucleótido único comunes se filtraron mediante la base de datos gnomAD (frecuencia alélica ≤ 0.0001), y las alteraciones en el número de copias se analizaron con CNVkit (v0.9.6.dev0). Las variantes fueron validadas manualmente y clasificadas usando bases de datos públicas (COSMIC, cBioPortal, ClinVar, VarSome, OncoKB).

VIGex

Esta firma, desarrollada en el VHIO, se diseñó para capturar el contexto inmunitario inflamatorio del tumor con el objetivo de convertirse en una herramienta predictiva de respuesta a inmunoterapia. El análisis se llevó a cabo utilizando ARN extraído de muestras tumorales fijadas en formol e incluidas en parafina, seguido de su procesamiento mediante la plataforma nCounter (NanoString) y secuenciación masiva en plataformas como Illumina. Las lecturas de secuenciación obtenidas se alinean contra un genoma de referencia para cuantificar la expresión de 12 genes específicos asociados con la activación inmunológica (CXCL9, CXCL10, CXCL11, IFNG, PRF1, IL7R, GZMA, GZMB) y el agotamiento de células T (PDCD1, CTLA-4, CD274, FOXP3). Los niveles de expresión de estos genes se normalizan y se integran en un algoritmo que genera el VIGex score, un puntaje que clasifica los tumores en tres categorías de respuesta inmune: "caliente" (*Hot*), "intermedio-frío" (*I-Cold*) y "frío" (*Cold*), reflejando la densidad y actividad del infiltrado inmune en el microambiente tumoral (217).

5.5. Análisis estadístico

Dado el carácter exploratorio del proyecto, el tamaño de la muestra de estudio no se definió en función de objetivos específicos previamente establecidos. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software R, versión 4.2.3.

En la primera parte, se realiza un análisis descriptivo de la población global del estudio, recopilando las variables clínico-patológicas más relevantes y comparándolas posteriormente entre las tres cohortes predeterminadas. Las variables categóricas se describieron mediante frecuencias absolutas y porcentajes (n, %), mientras que las variables continuas sin distribución normal se analizaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas y se presentaron como medianas y rangos intercuartílicos. Para comparar las variables continuas sin distribución normal entre las tres cohortes, se utilizó el test de Kruskal-Wallis, considerando estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0.05. La asociación entre variables categóricas se evaluó mediante la prueba de chi-cuadrado de independencia o, en caso de frecuencias esperadas bajas, con la prueba exacta de Fisher. Para controlar el riesgo de errores tipo I y reducir la posibilidad de falsos positivos, se aplicó una corrección de comparaciones múltiples utilizando la tasa de falso descubrimiento (FDR), ajustando los valores de p obtenidos y garantizando la robustez de los resultados estadísticos.

La SG de la población de estudio se calculó desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de fallecimiento por cualquier causa o la última fecha de seguimiento disponible para los pacientes censurados (31 de diciembre de 2019). Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier, y las diferencias entre las cohortes fueron evaluadas utilizando la prueba de log-rank.

En una segunda fase, y con la colaboración del Grupo de Bioinformática del VHIO, se llevó a cabo un análisis global de la cohorte de estudio para evaluar la relación entre el perfil mutacional de los pacientes y su patrón de diseminación metastásica. Para ello, se compararon las mutaciones identificadas en cada paciente con la distribución de las metástasis, con el objetivo de detectar posibles asociaciones entre alteraciones genómicas específicas y la afectación metastásica hepática o extrahepática. Se consideraron exclusivamente las

variantes patogénicas identificadas. Se excluyeron las variantes de significado incierto y las alteraciones en el número de copias, tanto ganancias como pérdidas. Además, no se disponía de datos de metilación en las muestras analizadas. Se realizaron análisis de asociación comparando los grupos A vs B vs C, (A+B) vs C y A vs (B+C), evaluando el número y tipo de mutaciones patogénicas mediante la prueba de Wilcoxon, y la presencia de mutaciones específicas en cada gen utilizando la prueba exacta de Fisher (en genes con mutaciones en al menos tres muestras por grupo). Los valores p se ajustaron para comparaciones múltiples con el método de Benjamini-Hochberg.

Posteriormente, se realizó un análisis de agrupación de mutaciones con el objetivo de identificar asociaciones y combinaciones que pudieran estar relacionadas con patrones específicos de diseminación metastásica. Para ello, los genes fueron clasificados siguiendo enfoques biológicamente coherentes, como los criterios de los *hallmarks* del cáncer, las vías de señalización celular y/o procesos biológicos fundamentales, con el fin de establecer agrupaciones funcionalmente relevantes. Se evaluó el número de genes alterados por cada muestra mediante Kruskal-Wallis. Cuando esta prueba evidenció resultados significativos ($p < 0.05$, p ajustado < 0.25), se realizaron análisis *post hoc* con la prueba de Dunn para identificar diferencias específicas entre grupos, aplicando un umbral de significación más estricto ($p < 0.05$, p ajustado < 0.05) para reducir falsos positivos. La asociación entre la alteración de las vías (definida como la mutación de al menos un gen de la vía) y cada grupo de estudio se analizó mediante la prueba exacta de Fisher, y los valores p fueron ajustados nuevamente para comparaciones múltiples con el método de Benjamini-Hochberg. Estos análisis se realizaron en dos subconjuntos de datos: el conjunto de datos del VHIO card-300 y el conjunto combinado de datos del VHIO card-300 y Amplicon Hiplex.

Para su realización, se emplearon las siguientes bases de datos: *Cancer Hallmark Genes*, que clasifica los genes en los 10 rasgos característicos del cáncer definidos por Hanahan & Weinberg en 2011 (218); *Cosmic Cancer Gene Census Hallmarks*, que clasifica los genes del cáncer en los 14 rasgos característicos actualizados por Hanahan en 2022 (219); la unión entre *Cancer*

Hallmark Genes y *Cosmic Cancer Gene Census Hallmarks*; *Oncogenic Signaling Pathways*, que clasifica los genes en 10 vías de señalización oncogénica derivadas de las cohortes del TCGA (220); y *Pancancer Significantly Mutated Genes*, que clasifica los genes impulsores del cáncer en 24 procesos biológicos relacionados con el cáncer y las vías asociadas derivadas de las cohortes del TCGA (221). Dado que estas bases de datos se han utilizado como fuente para la clasificación de genes en el presente estudio, sus referencias bibliográficas han sido incluidas en la sección correspondiente.

Finalmente, se comparó el contexto inmunitario tumoral entre las tres cohortes del estudio utilizando la firma VIGex. La distribución de los resultados de VIGex entre los grupos se analizó con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Cuando este test identificó diferencias significativas, se realizaron comparaciones por pares mediante la prueba de Dunn, aplicando la corrección de Bonferroni para ajustar los valores p y minimizar el riesgo de errores tipo I.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

Para una mejor comprensión, el orden de los resultados no sigue la prioridad establecida en los objetivos, si no que se detallan de acuerdo con la metodología temporal transcurrida durante la realización de la tesis.

6.1. Características basales de la población de estudio

Inicialmente se seleccionaron 1263 pacientes con CCRm y enfermedad irresecable diagnosticados en el Hospital Vall de Hebrón entre el 1 de enero de 2010 y el 31 de diciembre de 2019. Tras excluir a 237 pacientes (18,7%) con mutación en *BRAF*^{V600E} y/o presencia de MSI, la población final del estudio incluyó un total de 1.026 pacientes. El diagrama de flujo del estudio, que describe la distribución de los pacientes incluidos y los análisis realizados en cada grupo, se presenta en la figura 12.

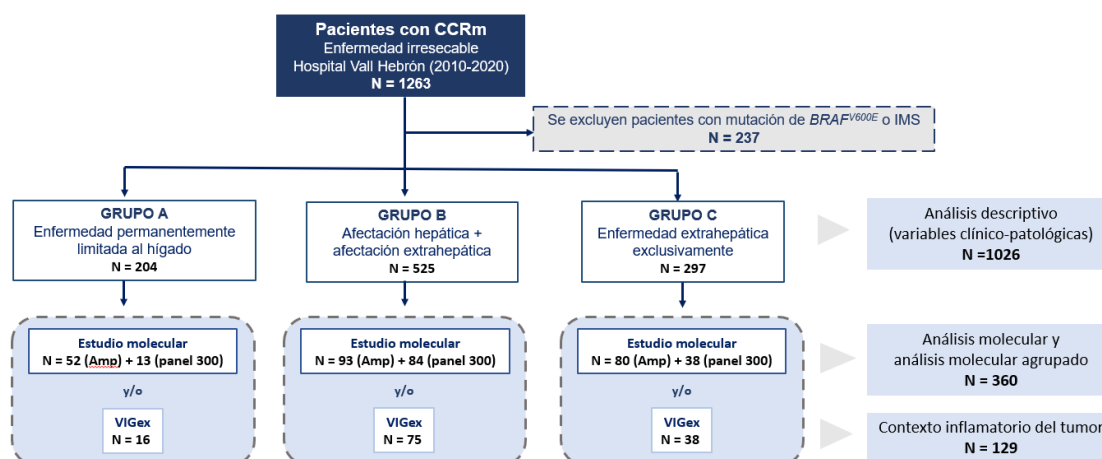


Figura 12. Diagrama de flujo del estudio con el número de pacientes y de análisis realizados en cada una de las tres cohortes.

De los 1.026 pacientes incluidos, 204 (19,9%) presentaron enfermedad permanentemente limitada al hígado (grupo A), 525 (51,2%) mostraron afectación hepática y extrahepática (grupo B), y 297 (28,9%) presentaron únicamente enfermedad extrahepática (grupo C). La distribución de los pacientes entre los grupos se muestra en la figura 13.

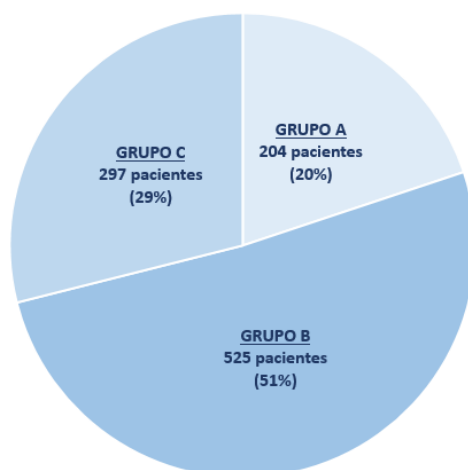


Figura 13. Distribución de frecuencia de las tres cohortes en la población de estudio.

6.2. Características clínico-patológicas de la población de estudio

Las características de los pacientes en los distintos grupos analizados se resumen en la tabla 5. La mediana de edad fue de 64 años en el grupo A, y 62 años en los grupos B y C ($p=0.007$). La distribución por sexo mostró un patrón similar, con un 37% de mujeres en el grupo A y un 38% tanto en el grupo B como en el grupo C ($p>0.9$). En cuanto al estadiaje, disponible en el 63% de la población de estudio, no se observaron diferencias significativas en el valor T, con un 37% de pacientes con T4 en el grupo A y un 44% en los grupos B y C ($p=0.12$), ni en el estado ganglionar, con un 74% de N+ en el grupo A, un 83% en el grupo B y un 78% en el grupo C ($p=0.12$).

Se encontró un menor porcentaje de pacientes con enfermedad metacrónica en el grupo A (15%) en comparación con el grupo B (23%) y, especialmente, con el grupo C (59%), diferencia que resultó estadísticamente significativa ($p=0.005$). Estas diferencias en la distribución de tumores sincrónicos y metacrónicos según el grupo de estudio se ilustran en la figura 14. Asimismo, se observa que el grupo B presenta una distribución de tumores sincrónicos/metacrónicos más similar al grupo A que al grupo C. En este contexto, se observa un mayor porcentaje de pacientes del grupo C con el tumor primario intervenido (87%), en comparación con los pacientes del grupo B (55%) y del grupo A (56%), con $p<0.001$. Esto

resulta en una mayor proporción de pacientes en el grupo C que recibieron tratamiento adyuvante respecto a los otros dos grupos ($p<0.001$).

Respecto a la localización del tumor primario, si bien los tumores del lado derecho mostraron una distribución similar entre los grupos A, B y C (29%, 31% y 32%, respectivamente), se identificaron diferencias en la distribución de tumores de recto, con un 15%, 24% y 28% en los grupos A, B y C, respectivamente ($p=0.005$). La figura 15 ilustra la distribución de la localización tumoral en cada grupo del estudio, reflejando una menor presencia de tumores de recto en el grupo A.

Característica	Global, N = 1,026 ¹	Grupo A, N = 204 ¹	Grupo B, N = 525 ¹	Grupo C, N = 297 ¹	p-valor ²
Edad al diagnóstico (años)					0.007
Media (DE)	62 (12)	65 (12)	62 (12)	62 (13)	
Mediana (RIQ)	63 (55, 71)	64 (57, 74)	62 (54, 70)	62 (54, 71)	
Rango	22, 92	31, 87	23, 92	22, 91	
Género					>0.9
Mujer	387 (38%)	76 (37%)	197 (38%)	114 (38%)	
Hombre	639 (62%)	128 (63%)	328 (62%)	183 (62%)	
Estadíaje T					0.4
T1-3	373 (57%)	69 (63%)	166 (56%)	138 (56%)	
T4	277 (43%)	40 (37%)	129 (44%)	108 (44%)	
Estadíaje N					0.12
N0	134 (21%)	29 (26%)	51 (17%)	54 (22%)	
N+	519 (79%)	82 (74%)	243 (83%)	194 (78%)	
Sincrónico/Metacrónico					<0.001
Sincrónico	698 (68%)	172 (85%)	404 (77%)	122 (41%)	
Metacrónico	322 (32%)	31 (15%)	118 (23%)	173 (59%)	
Localización tumor primario					0.005
Derecho	308 (31%)	57 (29%)	158 (31%)	93 (32%)	
Izquierdo	456 (46%)	108 (55%)	234 (45%)	114 (40%)	
Recto	235 (24%)	30 (15%)	124 (24%)	81 (28%)	
Cirugía tumor primario					<0.001
No	364 (35%)	90 (44%)	236 (45%)	38 (13%)	
Sí	662 (65%)	114 (56%)	289 (55%)	259 (87%)	
Quimioterapia adyuvante					<0.001
No	896 (87%)	191 (94%)	484 (92%)	221 (74%)	
Sí	130 (13%)	13 (6.4%)	41 (7.8%)	76 (26%)	
Seguimiento desde primera metástasis (meses)					<0.001
Media (DE)	27 (18)	23 (14)	26 (17)	31 (20)	
Mediana (RIQ)	24 (15, 36)	21 (12, 33)	23 (15, 34)	29 (16, 44)	
Rango	0, 118	1, 76	1, 118	0, 102	

¹ n (%)

² test de Kruskal-Wallis; prueba chi cuadrado de independencia

Tabla 5. Características demográficas y clínicas de la población total y de las cohortes del estudio.

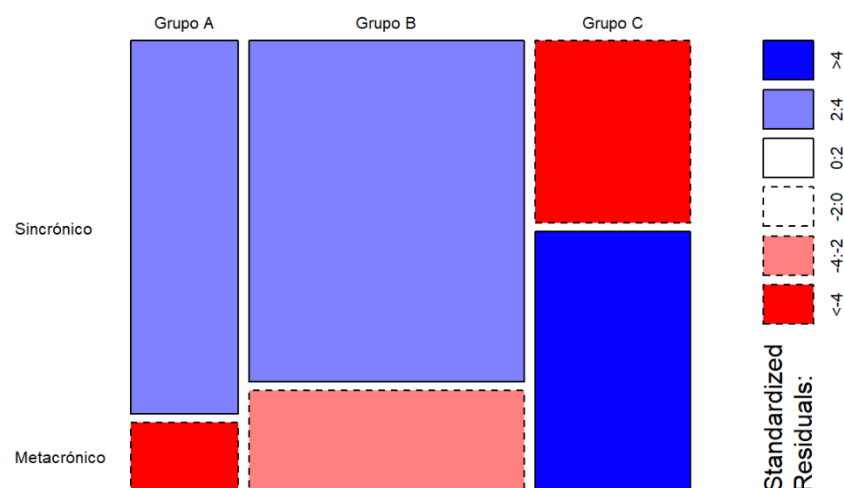


Figura 14. Distribución de tumores sincrónicos y metacrónicos en las diferentes cohortes analizadas. Se representan en rojo los grupos con una menor frecuencia observada que la esperada, mientras que en azul se representan los grupos con una mayor frecuencia observada respecto a la esperada.

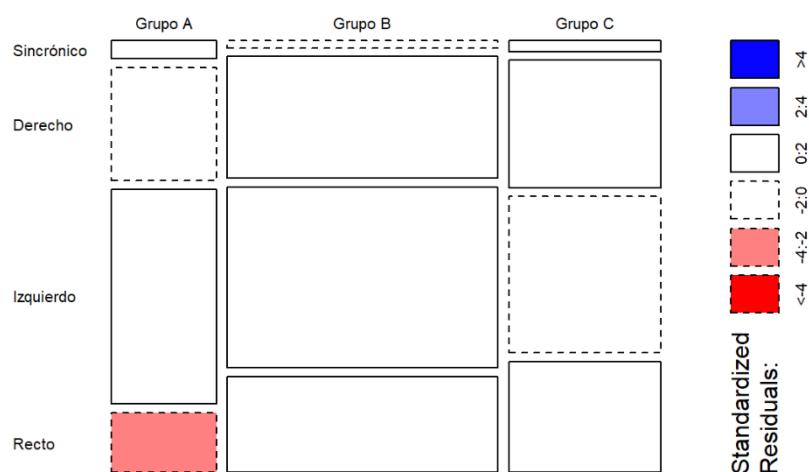


Figura 15. Distribución de la localización tumoral en las diferentes cohortes analizadas. Se representan en rojo los grupos con una menor frecuencia observada que la esperada.

En resumen, en el grupo de pacientes con enfermedad permanentemente limitada al hígado (grupo A) se observa una menor prevalencia de tumores originados en el recto y una mayor proporción de enfermedad metastásica sincrónica en comparación con los pacientes con enfermedad exclusivamente extrahepática.

6.2.1. Evolución temporal de los patrones de distribución metastásica.

La comparación entre las cohortes con fenotipos extremos (grupo A y grupo C) revela diferencias en la evolución temporal de la enfermedad. En la figura 16 se ilustra la trayectoria individual de cada paciente, mostrando que los pacientes del grupo C presentan un mayor número de casos con enfermedad localizada y con una mayor supervivencia que los del grupo A, sugiriendo una progresión más indolente en los pacientes del grupo C.

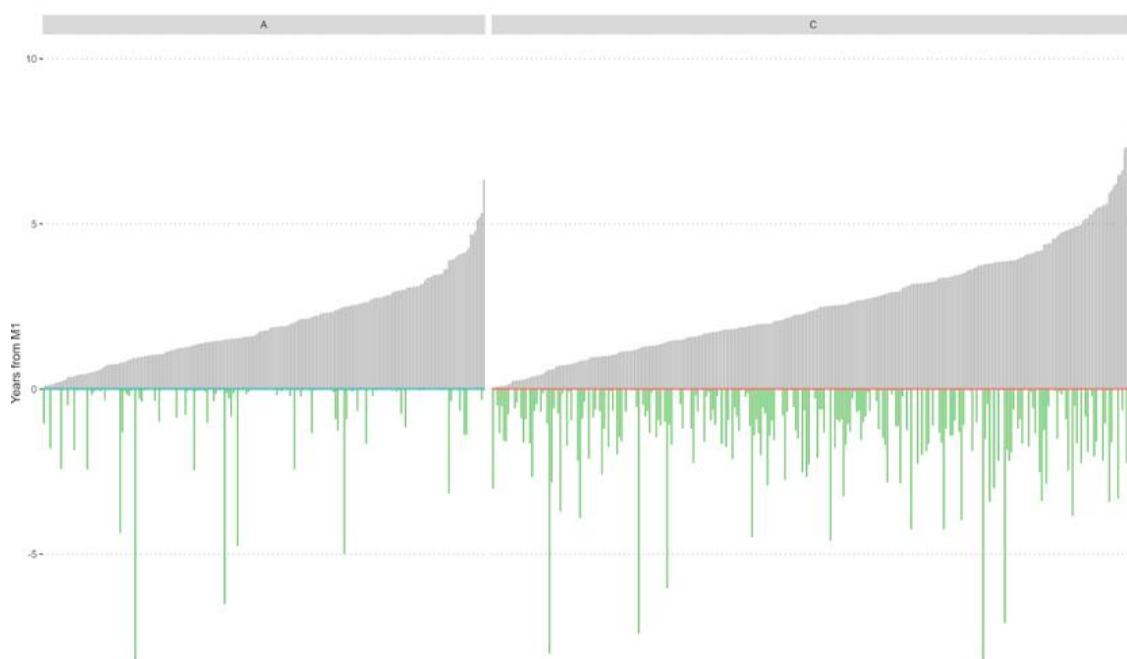


Figura 16. Dinámica temporal de la progresión de la enfermedad en pacientes de las cohortes con fenotipos clínicos extremos. Representación de los pacientes de los grupos A y C. Las líneas verdes indican el tiempo de enfermedad localizada, desde el diagnóstico del tumor primario (punto inferior) hasta el diagnóstico de la enfermedad metastásica (punto azul en grupo A, punto rojo en grupo C). En gris, se muestra el tiempo de enfermedad metastásica, desde su inicio hasta el fallecimiento o la pérdida de seguimiento.

No todos los pacientes incluidos en el estudio mantienen el mismo patrón de distribución metastásica a lo largo de su enfermedad oncológica, como se muestra en la figura 17. Para realizar este análisis, se dispone de información detallada de todas las exploraciones de imagen realizadas en 163 de los 525 pacientes del grupo B (31%). El 62,4% de los pacientes de este grupo presentaron afectación hepática y extrahepática desde el inicio de la enfermedad

metastásica (subgrupo B2). En el 26,7% de los casos, la enfermedad se manifestó inicialmente de forma exclusiva en el hígado, desarrollando metástasis extrahepáticas en una fase posterior (subgrupo B1). Finalmente, el 10,9% presentó afectación extrahepática en el momento del diagnóstico metastásico y posteriormente desarrolló compromiso hepático (subgrupo B3).

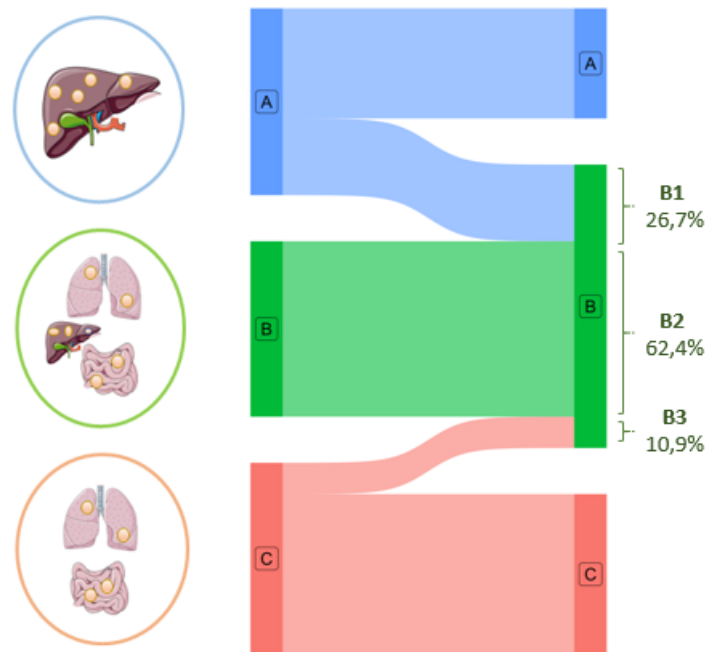


Figura 17. Flujos de transición de pacientes entre cohortes a lo largo del tiempo. El grosor de las líneas representa la magnitud de cada transición. El subgrupo B1 incluye pacientes con enfermedad hepática inicial que desarrollan enfermedad extrahepática posteriormente; B2, con afectación metastásica hepática y extrahepática al inicio; y B3, con afectación extrahepática inicial seguida de enfermedad hepática. (Análisis realizado en 163 pacientes del Grupo B)

Al analizar el tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la aparición de la primera metástasis, se observa que la mediana en el subgrupo B3 es de 5,6 meses, en comparación con 0,5 meses en el subgrupo B1 y 0,2 meses en el subgrupo B2 ($p < 0.001$), tal y como muestra la figura 18. Estos datos respaldan una evolución más indolente en aquellos pacientes cuyo debut metastásico ocurre exclusivamente a nivel extrahepático.

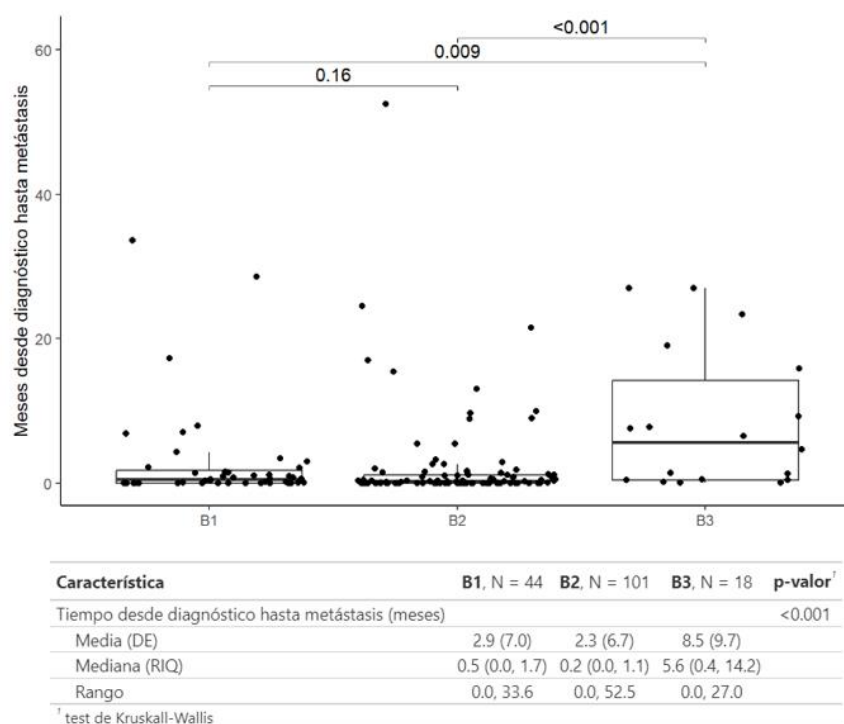


Figura 18. Tiempo desde el diagnóstico hasta la aparición de metástasis en diferentes subgrupos de pacientes. El subgrupo B1 incluye pacientes con enfermedad hepática inicial que desarrollan enfermedad extrahepática posteriormente; B2, con afectación metastásica hepática y extrahepática al inicio; y B3, con afectación extrahepática inicial seguida de enfermedad hepática. Abreviaturas: DE derivación estándar; RIQ: rango intercuartílico.

Al centrarnos en los pacientes que experimentan un cambio en el patrón de distribución metastásica durante la evolución de la enfermedad, observamos que los pacientes del subgrupo B1, quienes debutan con enfermedad exclusivamente hepática, presentan una mediana de 11,3 meses para desarrollar afectación extrahepática. De manera similar, los pacientes del subgrupo B3, que inician con enfermedad extrahepática, muestran una mediana de 11,8 meses hasta la aparición de metástasis hepática. Estos datos se resumen en la figura 19.

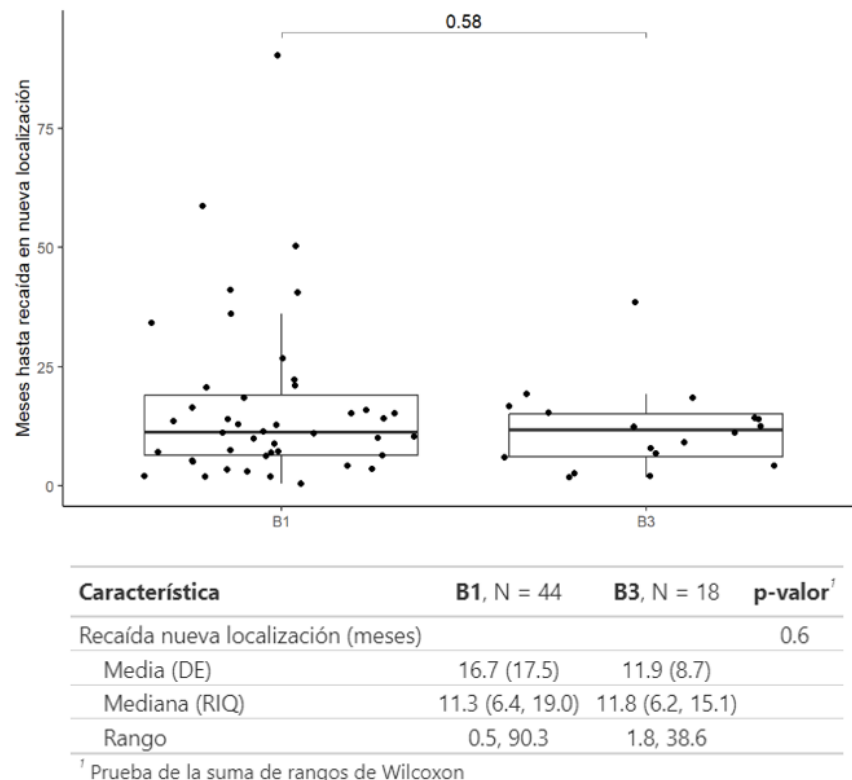


Figura 19. Tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta el desarrollo de metástasis en una nueva localización. El subgrupo B1 incluye pacientes con enfermedad hepática inicial que desarrollan enfermedad extrahepática posteriormente; y B3, con afectación extrahepática inicial seguida de enfermedad hepática. Abreviaturas: DE derivación estándar; RIQ: rango intercuartílico.

6.3. Perfil molecular de los distintos grupos de estudio

El perfil molecular se obtuvo principalmente a partir de dos paneles de genes utilizados en el programa de cribado molecular del VHIO entre 2010 y 2020: el panel Amplicon Hiplex, empleado en los primeros años del período de estudio, y el panel VHIO card-300, implementado a partir de 2017.

6.3.1. Características de las muestras analizadas

Se analizaron un total de 360 muestra, cada una correspondiente a un paciente, lo que representa el 35% de los pacientes de la población de estudio, de las cuales 225 corresponden al panel Amplicon y 135 al panel card-300, como se

muestra en la tabla 6. Del total de muestras, el 18,1% pertenecen al grupo A (equivalente al 31,8% de los pacientes de este grupo), el 49,2% al grupo B (equivalente al 33,7% de los pacientes de este grupo) y el 32,8% al grupo C (equivalente al 39,7% de los pacientes de este grupo), como se ilustra en la figura 20.

	Amplicon (N = 225)	VHIO card-300 (N = 135)	Total (N = 360)
Grupo A	52 (23,1%)	13 (9,6%)	65 (18,1%)
Grupo B	93 (41,3%)	84 (62,2%)	177 (49,2%)
Grupo C	80 (35,6%)	38 (28,1%)	118 (32,8%)

Tabla 6. Distribución de las muestras según los paneles realizados en cada cohorte del estudio.

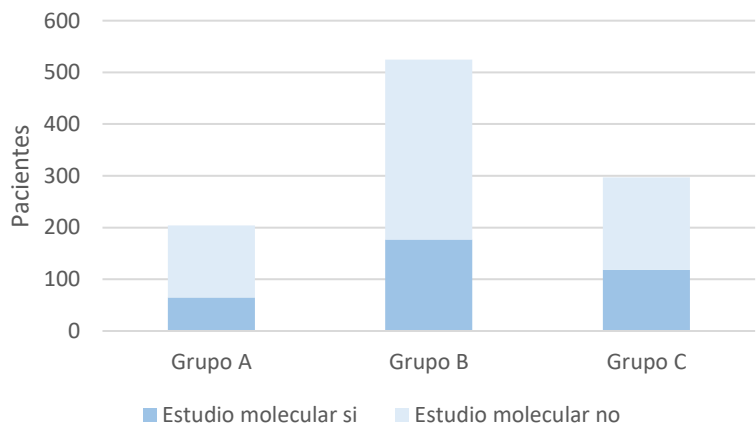


Figura 20. Proporción de pacientes con estudio molecular realizado. Diagrama de barras que muestra el porcentaje de pacientes con estudio molecular efectuado (azul oscuro) en comparación con los que no lo tienen (azul claro).

En cuanto al origen de las muestras analizadas, 134 de las 135 muestras evaluadas mediante el panel VHIO card-300 se obtuvieron del tumor primario. De manera similar, 194 de las 225 muestras analizadas mediante secuenciación por Amplicon también procedían del tumor primario. Las tablas 7 y 8 presentan un resumen detallado del origen de todas las muestras incluidas en el estudio.

VHIO card-300	Hígado	Tumor primario
Grupo A	1	12
Grupo B	0	84
Grupo C	0	38

Tabla 7. Procedencia de las muestras evaluadas con el panel 300-VHIO.

Amplicon	Tumor primario	Hígado	Pulmón	Peritoneo	Adenopatía	Intestino delgado	Ovario y trompa Falopio	Desconocido
Grupo A	42	9	0	0	1	0	0	0
Grupo B	82	8	1	0	0	0	1	1
Grupo C	70	0	4	1	3	1	1	0

Tabla 8. Procedencia de las muestras evaluadas con Amplicon.

6.3.2. Genes incluidos en el análisis

Es importante señalar la diferencia en el número de genes analizados por cada panel, cuyos detalles específicos se encuentran en el Anexo. El panel Amplicon abarca 60 genes, en los que se identificaron mutaciones en 24 de ellos, todas consideradas patogénicas. En cambio, el panel VHIO card-300, que evalúa un total de 435 genes, detectó mutaciones en 331 de ellos, de las cuales 79 son clasificadas como patogénicas. En el análisis combinado de los 57 genes comunes a ambos paneles, se observaron mutaciones en 52 de estos genes, de los cuales 31 se consideraron variantes patogénicas (tabla 9).

	Amplicon	VHIO card-300	Combinado
Genes analizados	60	434	57
Genes con mutación	24	331	52
Genes con mutación patogénica	24	79	31

Tabla 9. Número de genes analizados, mutaciones y variantes patogénicas según técnicas empleadas.

Para maximizar el tamaño de la muestra y aumentar la robustez de los análisis, se decidió integrar los resultados de ambas técnicas (Amplicon + VHIO card-300) en lugar de limitarse únicamente a la técnica con mayor número de genes analizados. Esta decisión permite aprovechar al máximo los datos disponibles

de cada paciente, aumentando la capacidad de detectar asociaciones significativas en un grupo más amplio de genes. La figura 21 muestra la distribución de genes mutados obtenidos mediante el análisis conjunto de ambas técnicas y su distribución entre las distintas cohortes del estudio.

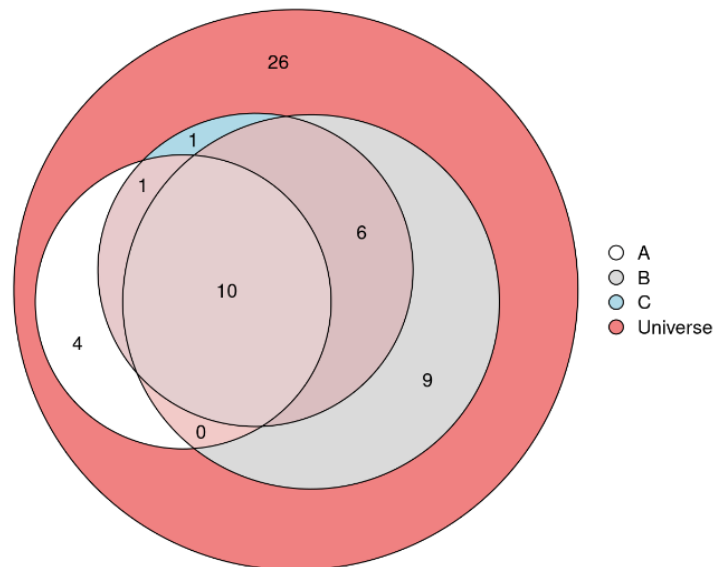


Figura 21. Número de mutaciones identificadas en las cohortes del estudio y su distribución. El diagrama de Euler ilustra el universo total de genes analizados y su distribución entre las cohortes, destacando los genes mutados exclusivos de cada cohorte y aquellos compartidos entre varias cohortes.

6.3.3. Resultados moleculares comparativos entre las cohortes del estudio

En este apartado, se comparan los perfiles mutacionales entre los grupos A, B y C. En primer lugar, se analiza el promedio de mutaciones detectadas en cada grupo, así como el número de genes con mutaciones patogénicas en cada caso. Estos resultados se resumen en las figuras 22 y 23 y en la tabla 10. La mediana de mutaciones patogénicas por muestra fue de 2,46 en el grupo A, 2,94 en el grupo B y 2,66 en el grupo C, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A y el grupo B (prueba de Kruskal-Wallis, $p=0.02$). De igual manera, la mediana del número de genes con al menos una mutación patogénica por muestra fue de 2,28 en el grupo A, 2,65 en el grupo B y 2,44 en el grupo C, con diferencias significativas entre el grupo A y el grupo B (prueba de Kruskal-Wallis, $p=0.01$).

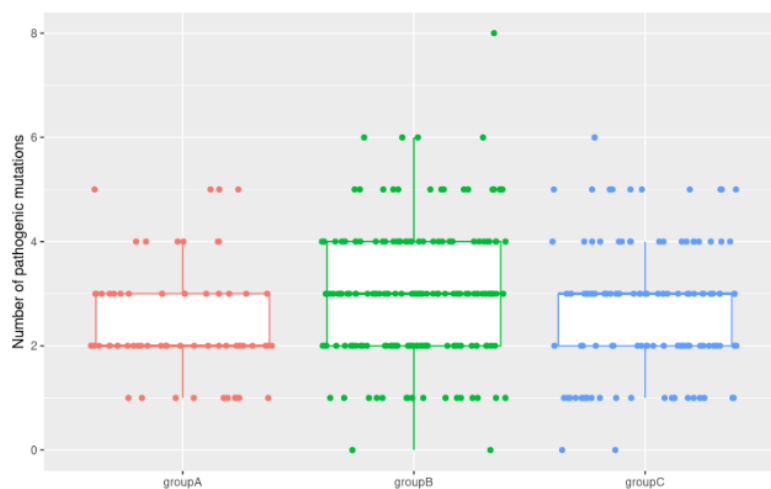


Figura 22. Número de mutaciones patogénicas por muestra en las tres cohortes. Comparación mediante prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.02$).

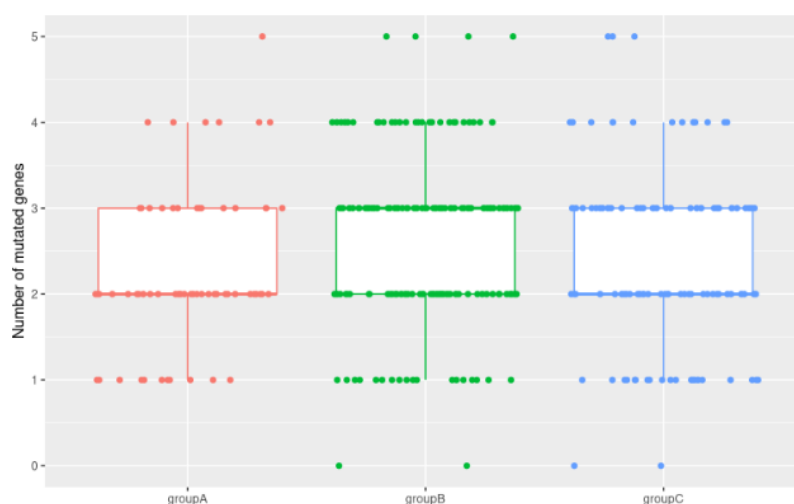


Figura 23. Número de genes mutados por muestra en las tres cohortes. Comparación mediante prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.01$).

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Número de mutaciones patogénicas por muestra (mediana)	2.46	2.94	2.66
Número de genes con una mutación patogénica por muestra (mediana)	2.28	2.65	2.44

Tabla 10. Mediana de mutaciones patogénicas y genes mutados en las tres cohortes. Prueba de Kruskal-Wallis: mutaciones ($p=0.02$) y genes mutados ($p=0.01$).

La tabla 11 muestra de forma descriptiva el número y el porcentaje de muestras con mutaciones patogénicas en genes específicos dentro de cada grupo,

considerando únicamente aquellos genes que presentan al menos una mutación en alguna de las muestras analizadas.

	Grupo A N = 65	Grupo B N = 177	Grupo C N = 118	Total N = 360
APC	45 (69%)	145 (82%)	82 (69%)	272 (76%)
TP53	47 (72%)	126 (71%)	75 (64%)	248 (69%)
KRAS	28 (43%)	105 (59%)	73 (62%)	206 (57%)
PIK3CA	8 (12%)	30 (17%)	17 (14%)	55 (15%)
SAMD4	4 (6%)	15 (8%)	12 (10%)	31 (9%)
FBXW7	3 (5%)	9 (5%)	11 (9%)	23 (6%)
NRAS	4 (6%)	10 (6%)	3 (3%)	17 (5%)
GNAS	0 (0%)	5 (3%)	2 (2%)	7 (2%)
PIK3R1	0 (0%)	5 (3%)	1 (1%)	6 (2%)
PTEN	2 (3%)	1 (1%)	1 (1%)	4 (1%)
ERBB2	0 (0%)	2 (1%)	2 (1%)	4 (1%)
ERBB3	0 (0%)	2 (1%)	2 (1%)	4 (1%)
RNF43	1 (2%)	1 (1%)	1 (1%)	3 (<1%)
CTNNB1	1 (2%)	1 (1%)	1 (1%)	3 (<1%)
NOTCH 1	0 (0%)	1 (1%)	2 (2%)	3 (<1%)
RUNX1	1 (2%)	0 (0%)	1 (1%)	2 (<1%)
MSH6	0 (0%)	2 (1%)	0 (0%)	2 (<1%)
AKT1	0 (0%)	1 (1%)	1 (1%)	2 (<1%)
ABL1	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (<1%)
NOTCH2	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (<1%)
SMARCB1	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (<1%)
MAP2K1	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (<1%)
CDKN2A	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (<1%)
PDGFRA	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (<1%)
FGFR3	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (<1%)
VHL	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (<1%)
CSFR1	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (<1%)
RET	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (<1%)
NOTCH3	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (<1%)
NOTCH4	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (<1%)
STK11	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	1 (<1%)

Tabla 11. Número y porcentaje de muestras con mutaciones patogénicas por gen y cohorte.

Entre las mutaciones detectadas con mayor frecuencia destacan *APC* (76%), *TP53* (69%), *KRAS* (57%) y *PIK3CA* (15%). Las mutaciones en *SAMD4*, *FBXW7*, *NRAS*, *GNAS* y *PIK3R1* se encontraron en un rango del 2 al 10% de las muestras, mientras que la incidencia del resto de las 22 mutaciones detectadas fue igual o inferior al 1%.

El análisis para evaluar si existían diferencias en la distribución de las mutaciones detectadas entre las distintas cohortes del estudio se centró en los 9 genes que presentaron mutaciones en al menos tres muestras de alguna de las cohortes. Utilizando la prueba exacta de Fisher, se identificaron diferencias significativas en los genes *APC* y *KRAS*. Sin embargo, no se encontraron asociaciones significativas entre la presencia de las demás mutaciones y las cohortes del estudio, como se muestra en la tabla 12.

Gen	P valor	P valor (ajustado)
<i>APC</i>	0.022	0.17
<i>KRAS</i>	0.037	0.17
<i>TP53</i>	0.322	0.54
<i>FBXW7</i>	0.326	0.54
<i>PIK3R1</i>	0.33	0.54
<i>NRAS</i>	0.363	0.54
<i>GNAS</i>	0.473	0.61
<i>SAMD4</i>	0.678	0.69
<i>PIK3C1</i>	0.686	0.69

Tabla 12. Análisis de la asociación entre mutaciones genéticas y las cohortes del estudio. Los valores p ajustados mediante el método de Benjamini-Hochberg (FDR) tras prueba exacta de Fisher.

En el caso de *APC*, el porcentaje de muestras con mutaciones fue significativamente mayor en el Grupo B en comparación con el Grupo C. En cuanto a *KRAS*, la frecuencia de mutaciones fue más alta en los Grupos B y C en relación con el Grupo A. Estos resultados se presentan en la tabla 13.

	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>
	P valor	P valor
Grupo A vs Grupo B	0.076	0.043
Grupo A vs Grupo C	1	0.043
Grupo B vs Grupo C	0.049	0.71

Tabla 13. Comparación de la distribución de *APC* y *KRAS* entre las cohortes del estudio.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de agrupación de las muestras basado en la similitud de sus perfiles mutacionales entre las tres cohortes del estudio. No se identificó una clasificación diferenciada que permitiera distinguir claramente cada cohorte, lo que sugiere que, en términos generales, los perfiles mutacionales son comparables entre los grupos, excepto por las diferencias previamente observadas en los genes *APC* y *KRAS*. Estos resultados se presentan en las figuras 24 y 25, donde la primera muestra la distribución de todas las mutaciones identificadas, mientras que la segunda se centra en las 10 mutaciones más prevalentes.

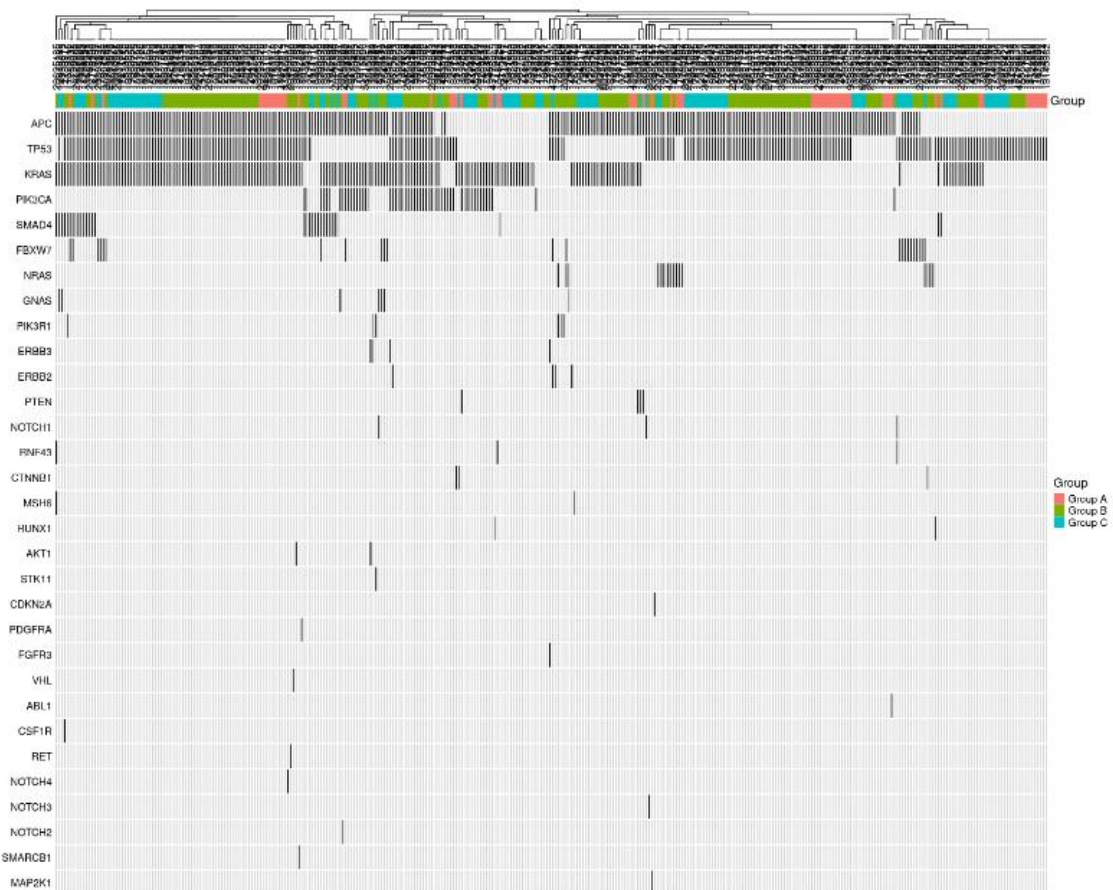


Figura 24. Representación gráfica mediante oncoplot de los genes mutados y su distribución en las tres cohortes del estudio.

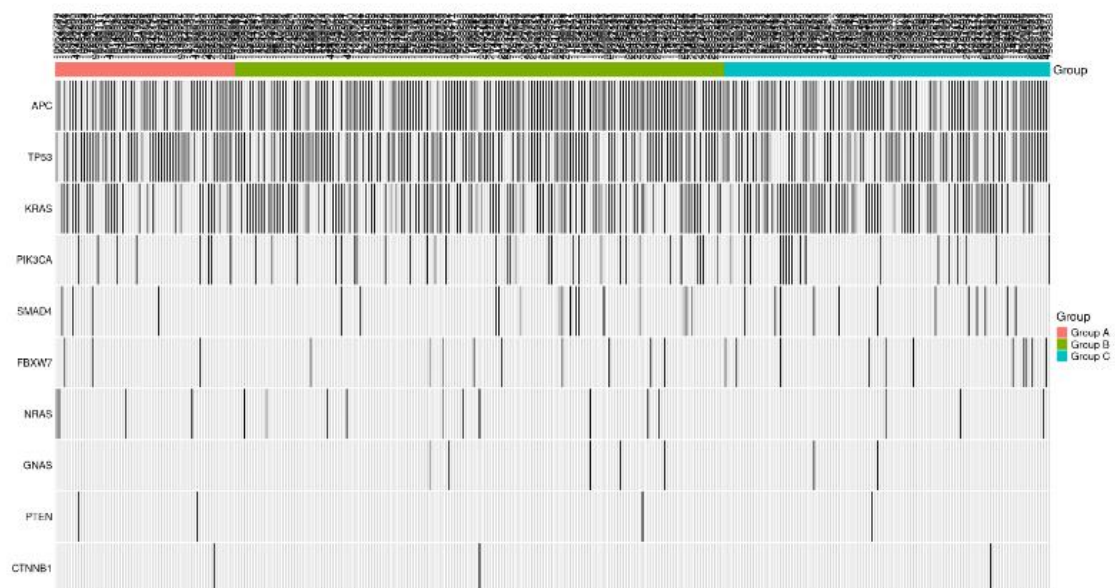


Figura 25. Representación gráfica de la distribución de las 10 mutaciones más comunes en la población del estudio, agrupadas entre las tres cohortes del estudio.

6.3.3.1. Resultados moleculares agrupando cohortes del estudio

Con el objetivo de identificar posibles asociaciones del perfil molecular entre las distintas cohortes del estudio, se evaluaron las diferencias en función de la presencia o ausencia de metástasis hepáticas (A+B vs. C) y de enfermedad extrahepática (A vs. B+C).

En cuanto a la presencia de metástasis hepáticas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A+B y C, como se muestra en la figura 26. Del mismo modo, no se identificaron asociaciones significativas en relación con la presencia de enfermedad extrahepática al comparar los grupos B+C con el grupo A, tal como se resume en la figura 27.



Figura 26. Representación gráfica mediante Oncoplot de los genes mutados y su distribución según la presencia o ausencia de metástasis hepáticas (cohortes A+B vs C).

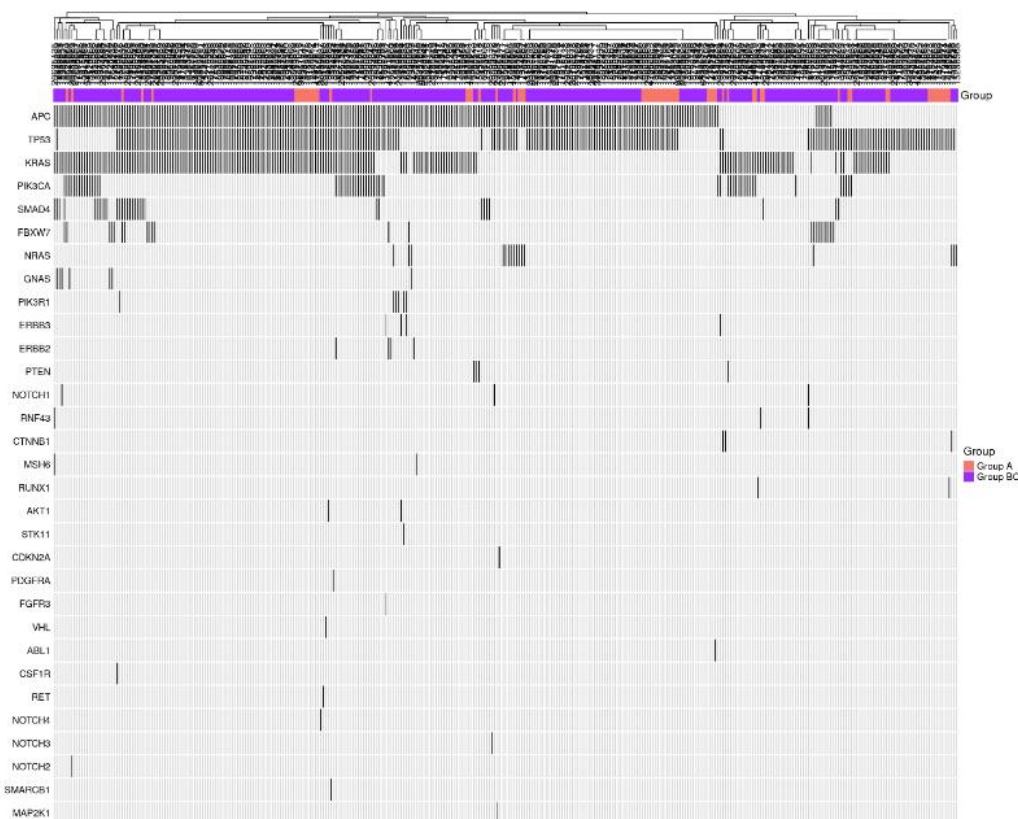


Figura 27. Representación gráfica mediante Oncoplot de los genes mutados y su distribución según la presencia o ausencia de metástasis extrahepáticas (cohortes A vs B+C).

6.3.4. Análisis molecular por agrupación de genes

Se llevó a cabo un análisis de agrupación de mutaciones con el objetivo de evaluar su relación con los distintos patrones de diseminación metastásica. Para ello, se establecieron agrupaciones considerando la implicación de cada mutación en distintos mecanismos biológicos relevantes en la progresión tumoral, incluyendo los *hallmarks* del cáncer y vías de señalización celular. Ante la ausencia de un consenso unificado en la clasificación de genes dentro de estos procesos, y considerando tanto la interconexión de las rutas moleculares como el conocimiento aún limitado en este ámbito, se llevó a cabo un análisis comparativo utilizando distintas bases de datos previamente publicadas.

Las bases de datos seleccionadas incluyen: *Cancer Hallmark Genes*, *Cosmic Cancer Gene Census Hallmarks*, la unión entre *Cancer Hallmark Genes* y

Cosmic Cancer Gene Census Hallmarks, Oncogenic Signaling Pathways y Pancancer Significantly Mutated Genes (218–221).

6.3.4.1. Análisis molecular basado en Cancer Hallmark Genes.

Esta base de datos, publicada por Zhang y col. en 2020 (218), incluye los 10 *hallmarks* del cáncer publicados por Hanahan y Weinberg en 2011 (222). En la tabla 14 se presenta el número de genes asociados a cada *hallmark* según la base de datos, así como el número de genes evaluados en nuestra población para cada uno de estos *hallmarks*.

	<i>Cancer Hallmark Genes</i>	Genes analizados en el estudio
Activación de la invasión y la metástasis	1149	33
Capacidad de inmortalidad replicativa	308	19
Evasión de los supresores del crecimiento	709	33
Evasión del sistema inmunitario	609	13
Inestabilidad genómica y acumulación de mutaciones	231	5
Promoción de la angiogénesis	508	25
Reprogramación del metabolismo energético	461	29
Resistencia a la muerte celular	1193	33
Mantenimiento de señales proliferativas	1314	40
Inflamación promotora del tumor	648	14

Tabla 14. Número de genes incluidos en cada *hallmark* del cáncer según la base de datos *Cancer Hallmark Genes* y su representación en nuestra población de estudio (218).

El mapa de calor, representado en la figura 28, proporciona una visión general de los genes analizados en nuestro estudio y que están incluidos en cada *hallmark*, destacando en rojo aquellos genes que presentan mutaciones patogénicas en las muestras de estudio. Los resultados revelan una gran superposición de genes entre los distintos *hallmarks* y demuestran que una proporción considerable de los genes analizados y alterados en nuestro estudio no está presente en la base de datos, lo que pone de manifiesto sus limitaciones en cuanto a cobertura y representatividad. Entre los genes con mutaciones

identificadas en nuestra población que no están incluidos en esta base de datos, destacan *FBXW7*, *RNF43*, *RUNX1*, *SMARCB1* y *VHL*.

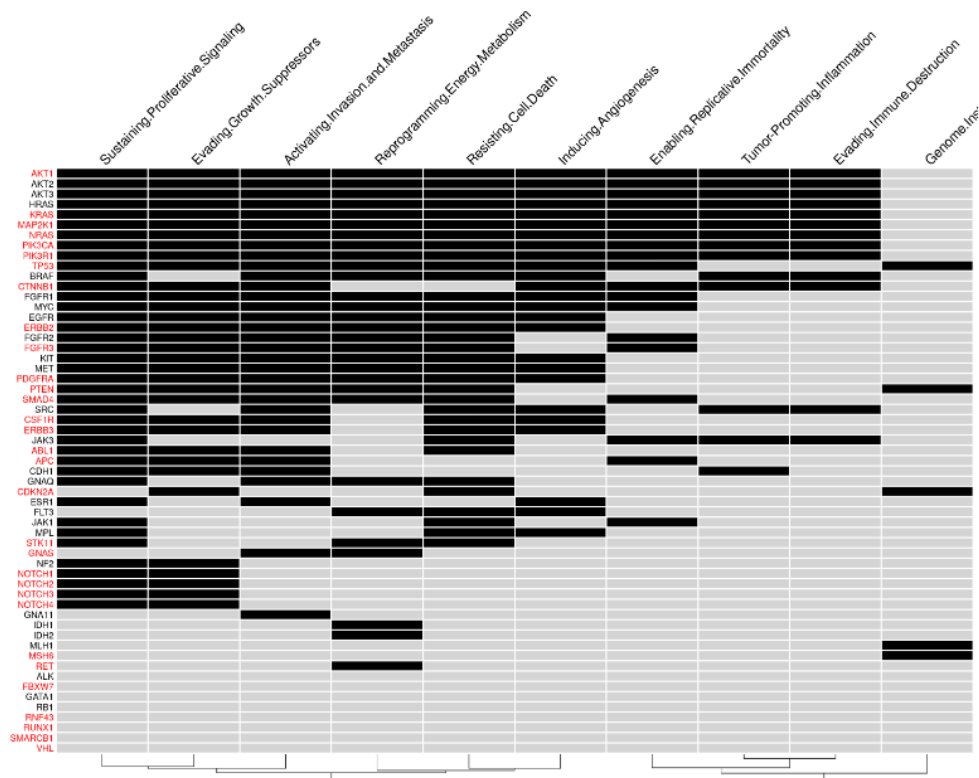


Figura 28. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada *hallmark* del cáncer según *Cancer Hallmark Genes*. El mapa de calor proporciona una visión global de los genes analizados, resaltando en rojo aquellos con mutaciones patológicas identificadas en nuestras muestras.

Para evaluar diferencias significativas en la cantidad de genes mutados por cada *hallmark* entre las distintas cohortes del estudio, se aplicó el test de Kruskal-Wallis de manera individual para cada *hallmark* de la base de datos *Cancer Hallmark Genes*. El análisis consideró el número de genes mutados por muestra, agrupando las muestras según su pertenencia a una de las tres cohortes del estudio (tabla 15). Los resultados destacaron diferencias significativas en 4 de los 10 *hallmarks* analizados.

Comparación del número de genes mutados por muestra en cada grupo		
	P Valor	P Valor ajustado
Activación de la invasión y la metástasis	0.01	0.04
Capacidad de inmortalidad replicativa	0.01	0.04
Evasión de los supresores del crecimiento	0.01	0.04
Evasión del sistema inmunitario	0.09	0.11
Inestabilidad genómica y acumulación de mutaciones	0.18	0.18
Promoción de la angiogénesis	0.06	0.11
Reprogramación del metabolismo energético	0.05	0.11
Resistencia a la muerte celular	0.11	0.12
Mantenimiento de señales proliferativas	0.01	0.04
Inflamación promotora del tumor	0.09	0.11

Tabla 15. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo y los distintos hallmarks según la base de datos Cancer Hallmark Genes. Evaluación del número de genes mutados por muestra en cada *hallmark* mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$, p ajustado < 0.25). Se destacan en negrita los resultados estadísticamente significativos.

En particular, el grupo B presentó un mayor número de genes mutados en varios *hallmarks* (activación de la invasión y metástasis, capacidad de inmortalidad replicativa, evasión de los supresores del crecimiento y mantenimiento de señales proliferativas) en comparación con el grupo A, tal y como se representa en la figura 29. En algunos casos, como en la activación de la invasión y metástasis, también se observó un mayor número de mutaciones en el grupo B frente al grupo C (valor p ajustado < 0.05).

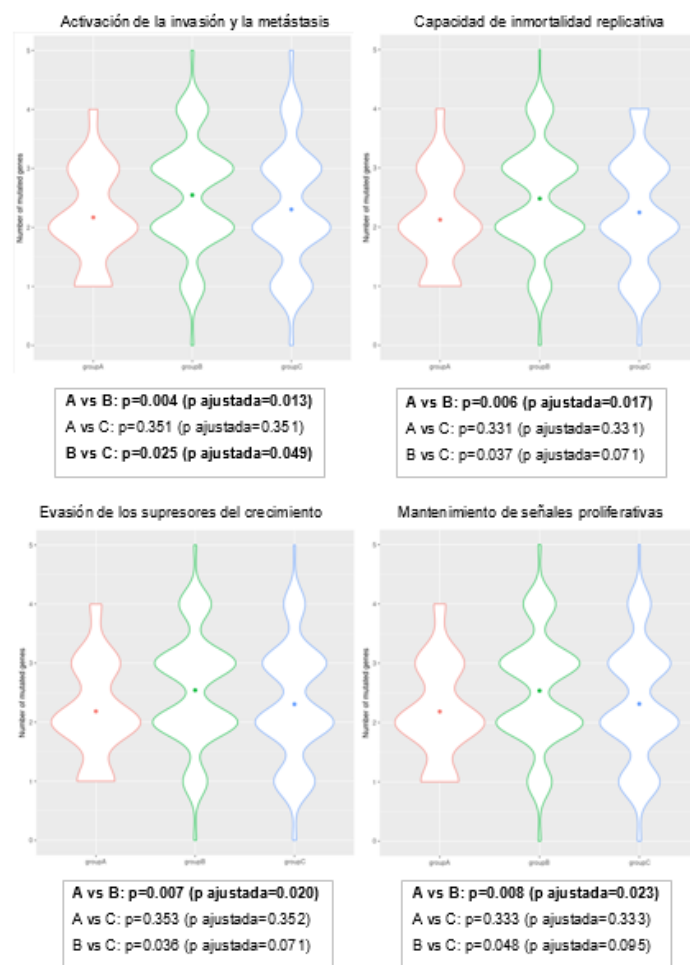


Figura 29. Correlación entre las cohortes del estudio y los *hallmarks* del cáncer según *Cancer Hallmark Genes*. El *violin plot* muestra la distribución del número de genes mutados por muestra en los distintos *hallmarks*, comparando las tres cohortes (A, B y C). La evaluación se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con comparaciones por pares utilizando la prueba de Dunn ($p < 0.05$, p ajustado < 0.05). Los resultados estadísticamente significativos se destacan en negrita.

6.3.4.2. Análisis molecular basado en *Cosmic Gene Consensus Hallmarks*.

Esta base de datos de genes asociados a cada *hallmark* del cáncer se obtiene de Cosmic (219). Incluye los 10 *hallmarks* del cáncer descritos por Hanahan y Weinberg en 2011, así como otros 4 procesos biológicos que reflejan los *hallmarks* emergentes descritos por Hanahan en 2022 (222,223). En la tabla 16 se presenta el número de genes asociados a cada *hallmark* según la base de datos, así como el número de genes evaluados en nuestra población para cada uno de estos *hallmarks*.

	<i>Cosmic Cancer Gene Census Hallmarks</i>	Genes analizados en el estudio
Activación de la invasión y la metástasis	206	38
Capacidad de inmortalidad replicativa	44	10
Evasión de los supresores del crecimiento	130	22
Evasión del sistema inmunitario	51	14
Inestabilidad genómica y acumulación de mutaciones	106	19
Promoción de la angiogénesis	78	19
Reprogramación del metabolismo energético	70	18
Resistencia a la muerte celular	202	37
Mantenimiento de señales proliferativas	176	34
Inflamación promotora del tumor	54	10
Regulación global de la expresión génica	68	9
Interacción con patógenos	16	4
Diferenciación y desarrollo	157	30
Senescencia	48	14

Tabla 16. Número de genes incluidos en cada *hallmark* del cáncer según la base de datos *Cosmic Gene Consensus Hallmarks* y su representación en nuestra población de estudio (219).

El mapa de calor representado en la figura 30 proporciona una visión general de los genes analizados en nuestro estudio y que están incluidos en cada uno de los *hallmarks* de esta base de datos, destacando en rojo aquellos genes que presentan mutaciones patogénicas en las muestras analizadas en este estudio. Del mismo modo que se evidenció con el análisis anterior, los resultados revelan una gran superposición de genes entre los distintos *hallmarks* y revelan una proporción considerable de los genes analizados en nuestro estudio que no está presente en la base de datos, lo que resalta nuevamente las limitaciones en la cobertura de la misma. Entre los genes con mutaciones identificadas en nuestra población que no están incluidos en esta base de datos, destacan *CSF1R*, *NOTCH3*, *NOTCH4* y *RUNX1*.

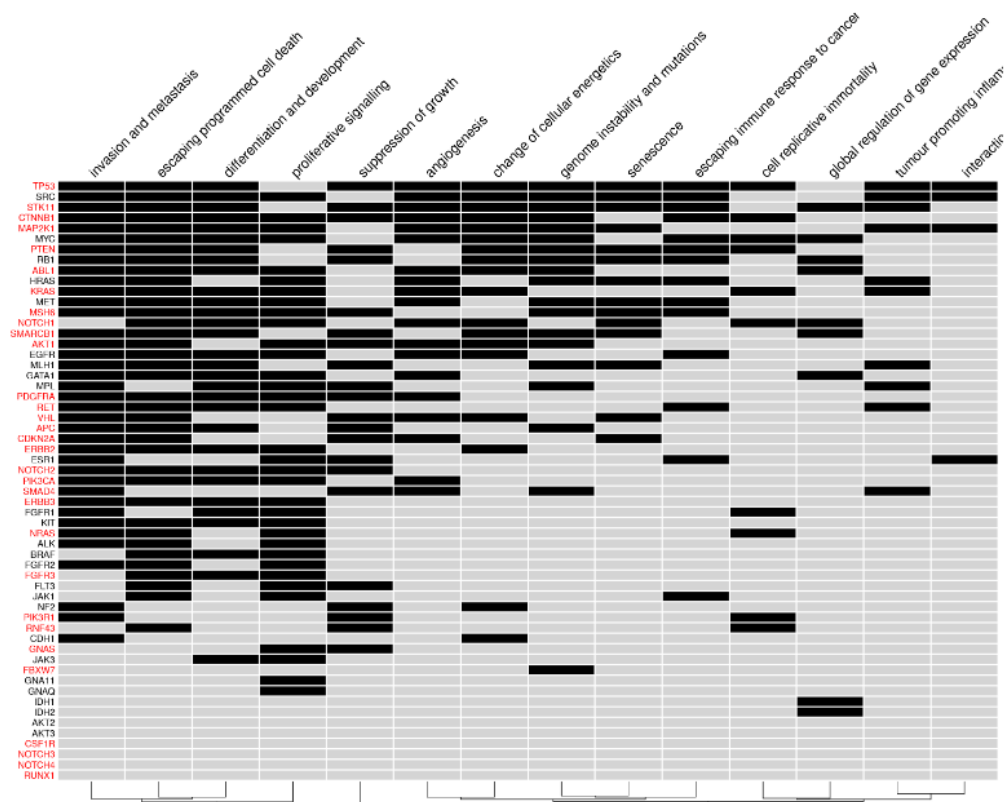


Figura 30. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada *hallmark* del cáncer según *Cosmic Gene Consensus Hallmarks*. El mapa de calor proporciona una visión global de los genes analizados, resaltando en rojo aquellos con mutaciones patológicas identificadas en nuestras muestras.

Para identificar diferencias significativas en la cantidad de genes mutados por *hallmark* entre las cohortes del estudio, se aplicó el test de Kruskal-Wallis para cada *hallmark* en la base de datos *Cosmic Gene Census Hallmarks*, evaluando el número de genes mutados por muestra y agrupando según la cohorte (tabla 17). Se detectaron diferencias significativas en 4 de los 14 *hallmarks* analizados: activación de la invasión y metástasis, evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular y diferenciación y desarrollo. Dos de estos *hallmarks* (activación de la invasión y metástasis, y evasión de los supresores del crecimiento) coinciden con los resultados obtenidos en la base de datos *Cancer Hallmark Genes*.

	Comparación del número de genes mutados por muestra en cada grupo	
	P valor	P valor ajustado
Activación de la invasión y la metástasis	0.01	0.12
Capacidad de inmortalidad replicativa	0.21	0.32
Evasión de los supresores del crecimiento	0.03	0.12
Evasión del sistema inmunitario	0.25	0.32
Inestabilidad genómica y acumulación de mutaciones	0.32	0.34
Promoción de la angiogénesis	0.26	0.32
Reprogramación del metabolismo energético	0.44	0.44
Resistencia a la muerte celular	0.02	0.12
Mantenimiento de señales proliferativas	0.06	0.17
Inflamación promotora del tumor	0.26	0.32
Regulación global de la expresión génica	0.27	0.32
Interacción con patógenos	0.28	0.32
Diferenciación y desarrollo	0.03	0.12
Senescencia	0.23	0.32

Tabla 17. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo y los distintos *hallmarks* según la base de datos *Cosmic Gene Consensus Hallmarks*. Evaluación del número de genes mutados por muestra en cada *hallmark* mediante la prueba de Kruskal-Wallis, ($p < 0.05$, p ajustado < 0.25). Se destacan en negrita los resultados estadísticamente significativos.

Se observa nuevamente un mayor número de genes mutados en el grupo B en comparación con el grupo A en tres *hallmarks*: activación de la invasión y metástasis, mantenimiento de señales proliferativas y diferenciación y desarrollo. Además, el grupo B presenta un mayor número de genes mutados en comparación con el grupo C en el *hallmark* de evasión de los supresores del crecimiento (figura 31).

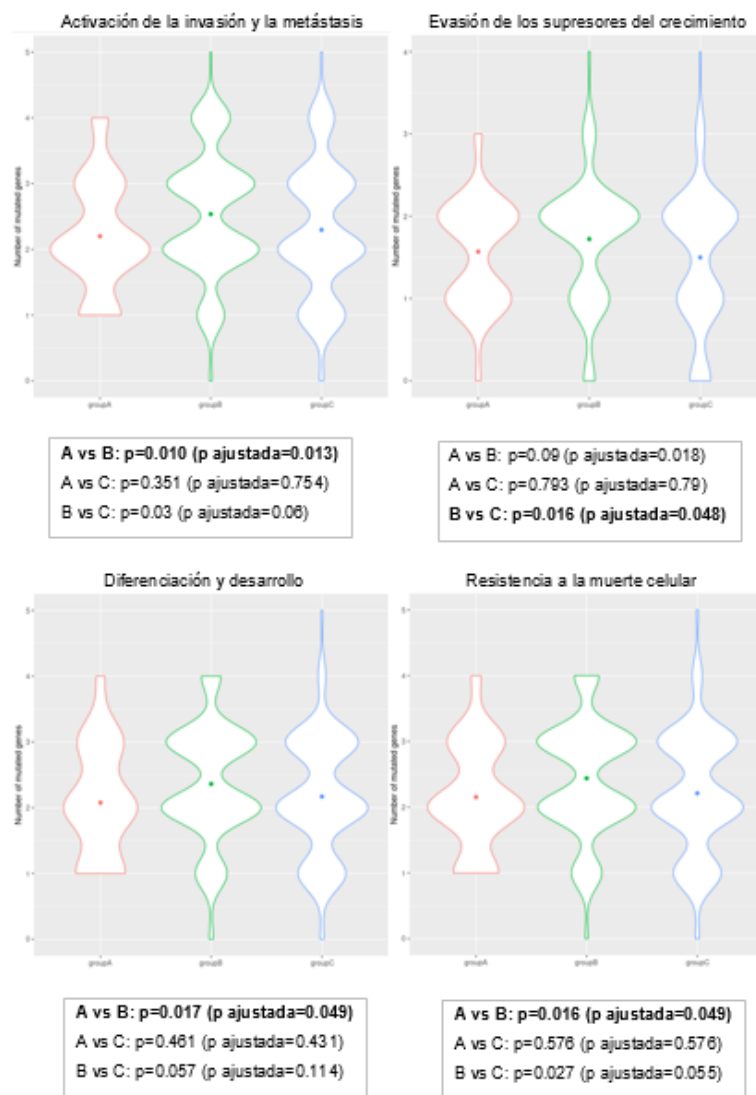


Figura 31. Correlación entre las cohortes del estudio y los *hallmarks* del cáncer según *Cosmic Gene Consensus Hallmarks*. El *violin plot* muestra la distribución del número de genes mutados por muestra en los distintos *hallmarks*, comparando las tres cohortes (A, B y C). La evaluación se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con comparaciones por pares utilizando la prueba de Dunn ($p < 0.05$, p ajustado < 0.05). Los resultados estadísticamente significativos se destacan en negrita.

6.3.4.3. Análisis molecular basado en la unión de Cancer Hallmarks Genes y Cosmic Gene Consensus Hallmarks.

La integración de las bases de datos *Cancer Hallmarks Genes* y *Cosmic Gene Consensus Hallmarks* permite ampliar la cobertura genética y reducir posibles sesgos de selección, facilitando la identificación de mutaciones relevantes y

validando los hallazgos a través de múltiples fuentes (218,219). Este análisis combinado se centra en los 10 *hallmarks* comunes entre ambas bases de datos. La figura 32 muestra la intersección entre los genes de *Cancer Hallmarks Genes* (CHG), *Cosmic Gene Consensus Hallmarks* y los genes cribados en nuestro estudio.

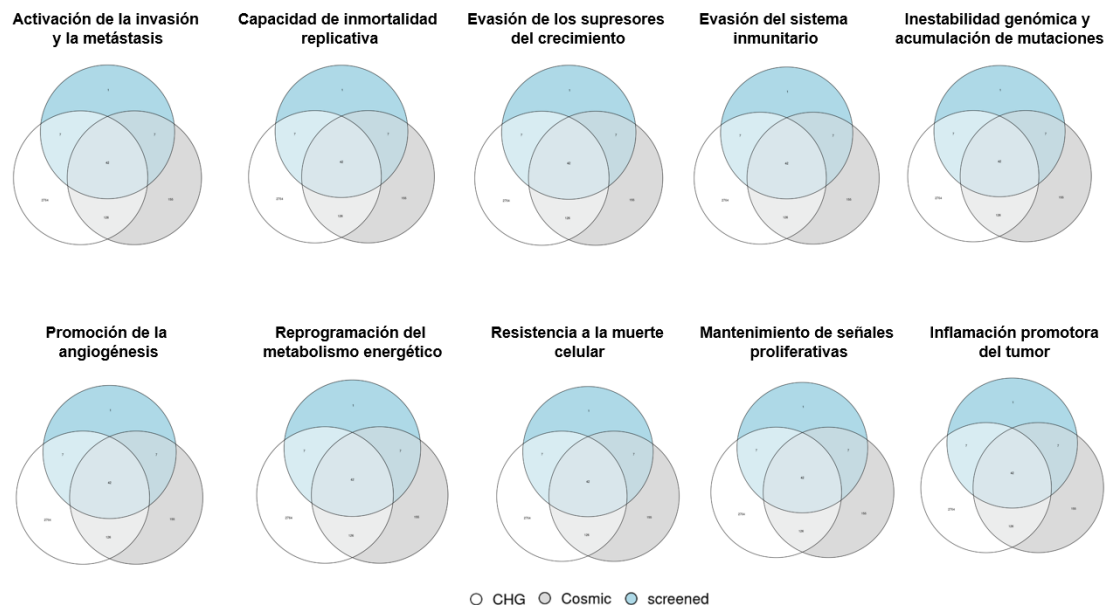


Figura 32. Intersección de genes entre *Cancer Hallmarks Genes*, *Cosmic Gene Consensus Hallmarks* y los genes evaluados en nuestra población. Diagrama de Venn que muestra las áreas de solapamiento y exclusividad entre los genes asociados a los *hallmarks* del cáncer según ambas bases de datos y los genes analizados en nuestro estudio. (218,219)

El mapa de calor representado en la figura 33, proporciona una visión general de los genes analizados en nuestro estudio y que están incluidos en cada base de datos, destacando en rojo aquellos genes que presentan mutaciones patogénicas en nuestras muestras. Los resultados revelan la heterogeneidad entre ambas bases de datos, aunque la unión de ambas permite minimizar el número de genes ausentes analizados en muestra población, quedando fuera de ellas únicamente un solo gen, RUNX1.

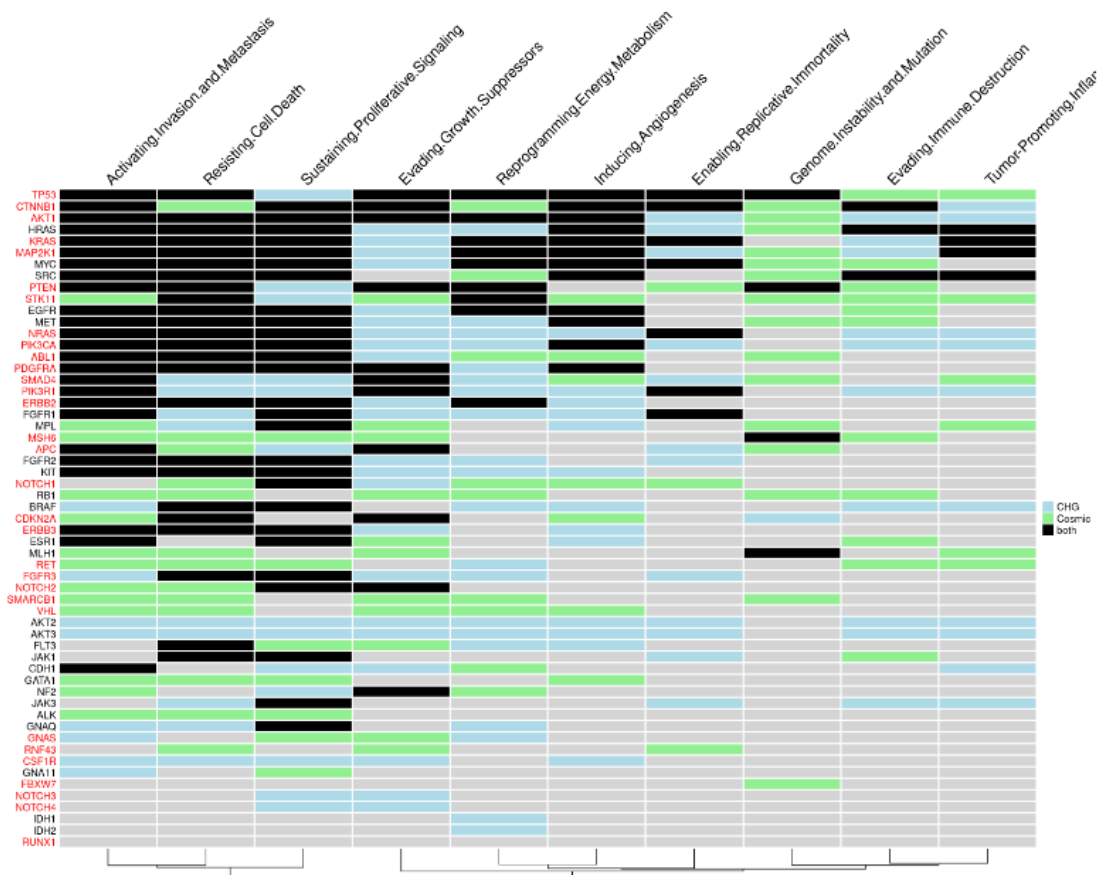


Figura 33. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada *hallmark* del cáncer según la unión de *Cancer Hallmarks Genes (CHG)* y *Cosmic Gene Consensus Hallmarks*. El mapa de calor proporciona una visión global de los genes analizados, resaltando en rojo aquellos con mutaciones patogénicas identificadas en nuestras muestras.

Para identificar diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de genes mutados por *hallmark* entre las distintas cohortes del estudio, se aplicó el test de Kruskal-Wallis de forma individual para cada *hallmark* presente en la base de datos conjunta. El análisis evaluó el número de genes mutados por muestra, agrupadas según su pertenencia a una de las tres cohortes (tabla 18). Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en 5 de los 10 *hallmarks* combinados analizados, observándose diferencias en el número de genes mutados por muestra en los siguientes hallmarks: activación de la invasión y metástasis, resistencia a la muerte celular, evasión de los supresores del crecimiento, mantenimiento de señales proliferativas y capacidad de inmortalidad replicativa.

	Comparación del número de genes mutados por muestra en cada grupo	
	P Valor	P Valor ajustado
Activación de la invasión y la metástasis	0.01	0.02
Capacidad de inmortalidad replicativa	0.02	0.04
Evasión de los supresores del crecimiento	0.01	0.02
Evasión del sistema inmunitario	0.11	0.13
Inestabilidad genómica y acumulación de mutaciones	0.29	0.29
Promoción de la angiogénesis	0.09	0.13
Reprogramación del metabolismo energético	0.09	0.13
Resistencia a la muerte celular	0.02	0.04
Mantenimiento de señales proliferativas	0.01	0.02
Inflamación promotora del tumor	0.16	0.17

Tabla 18. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo y los distintos *hallmarks* según la unión de las bases de datos de *Cancer Hallmarks Genes* y *Cosmic Gene Consensus Hallmarks*. Evaluación del número de genes mutados por muestra en cada *hallmark* mediante la prueba de Kruskal-Wallis, ($p < 0.05$, p ajustado < 0.25). Se destacan en negrita los resultados estadísticamente significativos.

En línea con los análisis anteriores, se observa nuevamente un mayor número de genes mutados en el grupo B en comparación con el grupo A en los cinco *hallmarks* mencionados: activación de la invasión y metástasis, resistencia a la muerte celular, evasión de los supresores del crecimiento, mantenimiento de señales proliferativas y capacidad de inmortalidad replicativa. Asimismo, el grupo B muestra un mayor número de genes mutados en comparación con el grupo C en los *hallmarks* de activación de la invasión y metástasis y mantenimiento de señales proliferativas. Estos hallazgos, representados en la figura 34, refuerzan la tendencia observada en los análisis previos, donde el grupo B destaca por una mayor cantidad de mutaciones en diversos procesos clave en la progresión tumoral.

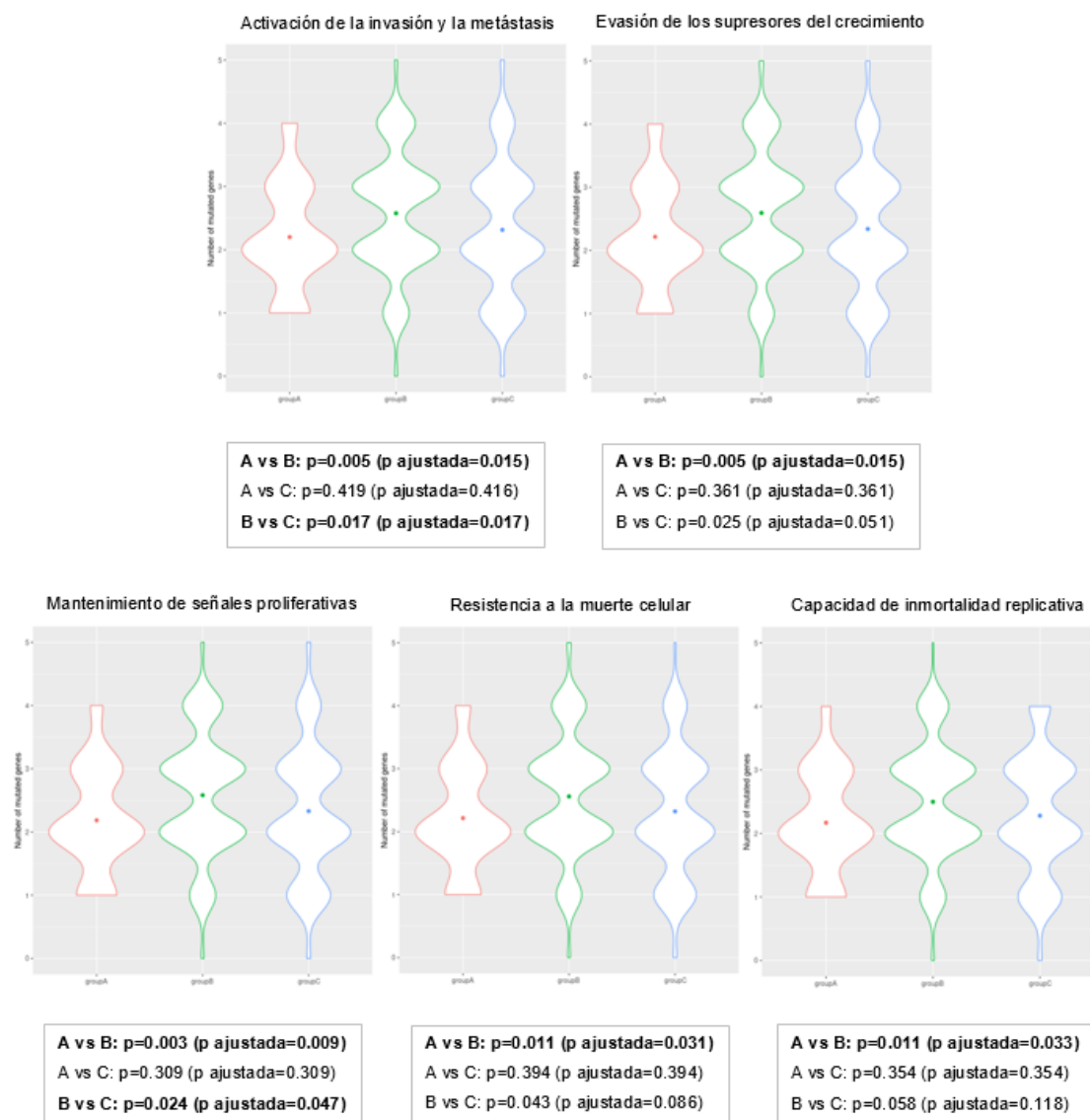


Figura 34. Correlación entre las cohortes del estudio y los *hallmarks* del cáncer según *Cancer Hallmarks Genes* y *Cosmic Gene Consensus Hallmarks*. El violin plot muestra la distribución del número de genes mutados por muestra en los distintos *hallmarks*, comparando las tres cohortes (A, B y C). La evaluación se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con comparaciones por pares utilizando la prueba de Dunn ($p < 0.05$, p ajustado < 0.05). Los resultados estadísticamente significativos se destacan en negrita.

6.3.4.4. Análisis molecular basado en *Oncogenic Signaling Pathways*

Como enfoque complementario, se exploró la posibilidad de agrupar los genes en función de vías de señalización intracelular específicas, en lugar de emplear exclusivamente la clasificación basada en los *hallmarks* del cáncer. Para este

análisis, se empleó una base de datos de genes asociados a 10 vías de señalización oncogénica, derivadas de cohortes del TCGA, lo que permite explorar las alteraciones moleculares desde una perspectiva complementaria (220). La tabla 19 muestra el número de genes asociados a cada vía de señalización según la base de datos, así como el número de genes evaluados en nuestra población para cada una de estas vías.

	Oncogenic Signaling Pathways	Genes analizados en el estudio
RTK/RAS	85	18
TP53	6	1
WNT	68	3
Ciclo Celular	15	2
HIPPO	38	1
MYC	13	1
NOTCH	71	5
NRF2	3	0
PI3K	29	7
TGF-Beta	7	1

Tabla 19. Número de genes incluidos en cada vía de señalización del cáncer según la base de datos *Oncogenic Signaling Pathways* y su representación en nuestra población de estudio (220).

El mapa de calor representado en la figura 35 proporciona una visión global de los genes analizados en este estudio y su distribución dentro de cada vía de señalización, resaltando en rojo aquellos que presentan mutaciones patogénicas en este estudio. A diferencia de lo observado en la clasificación basada en los *hallmarks* del cáncer, los resultados indican una ausencia de superposición de genes entre las distintas vías de señalización, lo que sugiere una segmentación funcional más definida. No obstante, una proporción considerable de los genes mutados identificados en nuestro estudio no se encuentra registrada en la base de datos utilizada, lo que pone nuevamente de manifiesto sus limitaciones en términos de cobertura. Entre las mutaciones patogénicas de nuestra población que no se encuentran representadas en esta base de datos, destacan *CSF1R*, *GNAS*, *MSH6*, *RUNX1*, *SMARCB1* y *VHL*.

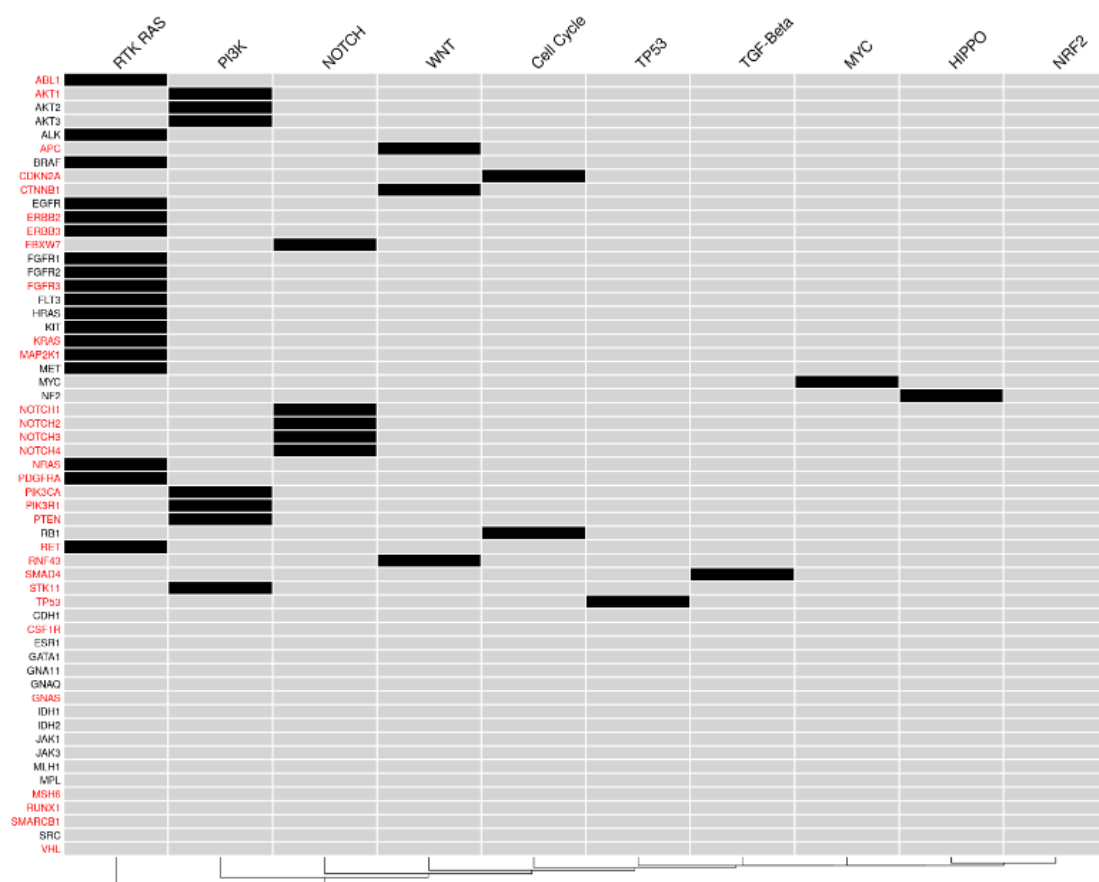


Figura 35. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada vía de señalización del cáncer según *Oncogenic Signaling Pathways*. El mapa de calor proporciona una visión global de los genes analizados, resaltando en rojo aquellos con mutaciones patogénicas identificadas en nuestras muestras.

Para identificar diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de genes mutados por vía de señalización entre las distintas cohortes del estudio, se aplicó el test de Kruskal-Wallis de forma individual para cada vía presente en la base de datos *Oncogenic Signaling Pathways*. Se evaluó el número de genes mutados por muestra, agrupadas según la pertenencia a una de las tres cohortes. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el número de genes mutados por muestra entre las diversas vías de señalización intracelular. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la alteración de vías

específicas (definida como la mutación de al menos un gen) entre los grupos de metástasis representados por las tres cohortes (A, B y C) (tabla 20).

Comparación del número de genes mutados por muestra en cada grupo		
	P Valor	P Valor ajustado
RTK/RAS	0.09	0.31
TP53	0.31	0.61
WNT	0.04	0.28
Ciclo Celular	0.59	0.65
TGF-Beta	0.65	0.65
NOTCH	0.35	0.61
PI3K	0.44	0.62
HIPPO	-	-
MYC	-	-
NRF2	-	-

Tabla 20. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo y las distintas vías de señalización según Oncogenic Signaling Pathways. Evaluación del número de genes mutados por muestra en cada *hallmark* mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con comparaciones por pares utilizando la prueba de Dunn ($p < 0.05$, p ajustado < 0.05). Se destacan en negrita los resultados estadísticamente significativos.

Se llevó a cabo un análisis complementario basado exclusivamente en los resultados del Panel VHIO card-300, dado que en este panel cada mutación se asigna a una única vía de señalización, lo que permite una clasificación más específica y exhaustiva con un mayor número de genes representados. La mayor cobertura génica de este panel amplía significativamente el alcance del análisis de vías de señalización, proporcionando una caracterización más detallada de los mecanismos moleculares implicados.

En este sentido, la figura 36 muestra la distribución de las mutaciones detectadas en el Panel VHIO card-300 para cada vía de señalización. En total, se incluyen 116 genes comunes entre el Panel VHIO card-300 y la base de datos, de los cuales 44 presentan mutaciones patogénicas. La tabla 21 muestra la asociación entre el número de genes mutados por vía, y la tabla 22 presenta la correlación

entre los grupos, donde se observa un enriquecimiento de la vía de WNT en los pacientes del grupo B.

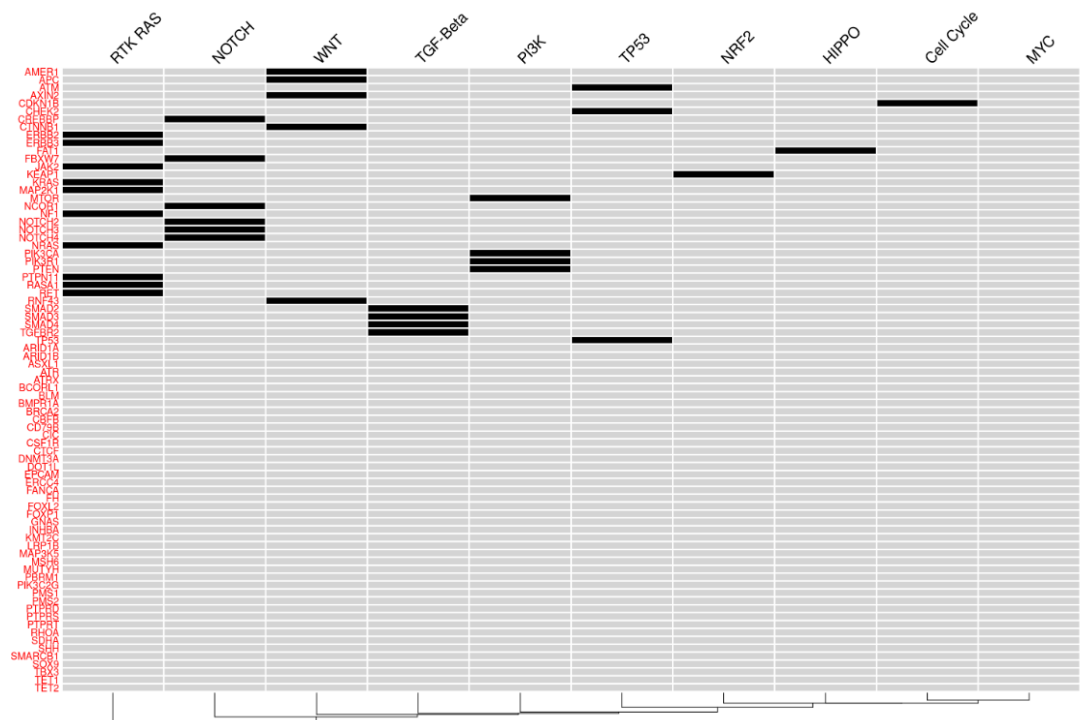


Figura 36. Distribución de los genes evaluados exclusivamente con panel 300 y su asociación con cada vía de señalización del cáncer según *Oncogenic Signaling Pathways*. El mapa de calor proporciona una visión global de los genes analizados, resaltando en rojo aquellos con mutaciones patológicas identificadas en nuestras muestras.

Comparación del número de genes mutados por muestra en cada grupo		
	P Valor	P Valor ajustado
RTK/RAS	0.98	0.98
TP53	0.91	0.98
WNT	0.01	0.13
Ciclo Celular	0.74	0.95
TGF-Beta	0.64	0.95
NOTCH	0.58	0.95
PI3K	0.16	0.47
HIPPO	0.08	0.34
NRF2	0.74	0.95
MYC	-	-

Tabla 21. Asociación entre el número de genes mutados por muestra en cada grupo, analizados únicamente con panel 300, y las distintas vías de señalización según *Oncogenic Signaling Pathways*. Evaluación del número de genes mutados por muestra en cada *hallmark* mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$, p ajustado < 0.25). Se destacan en negrita los resultados estadísticamente significativos.

WNT		
	P valor	P valor ajust.
Grupo A vs Grupo B	0.99	0.99
Grupo A vs Grupo C	0.08	0.17
Grupo B vs Grupo C	0.004	0.013

Tabla 22. Correlación entre las cohortes del estudio y las distintas vías de señalización según *Oncogenic Signaling Pathways*. Evaluación del número de genes mutados por muestra en cada vía mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con comparaciones por pares utilizando la prueba de Dunn ($p < 0.05$, p ajustado < 0.05). Se destacan en negrita los resultados estadísticamente significativos.

Las diferencias observadas en el enriquecimiento de la vía de WNT en la cohorte B podrían explicarse fundamentalmente por el mayor número de mutaciones detectadas en el gen *APC* en esta cohorte, como se evidenció en el análisis previo de mutaciones individuales.

6.3.4.5. Análisis molecular basado en *Pancancer Significantly Mutated Genes*

En este apartado, las agrupaciones se establecen a partir de una base de datos que clasifica los genes según distintos procesos biológicos relacionados con el cáncer. Este enfoque diferente puede complementar los análisis previos, en los que la clasificación se realizó en función de los *hallmarks* del cáncer o de vías de señalización celular. En este caso, los datos se extraen de una base de datos derivada de cohortes del TCGA (221). En la tabla 23 se presenta el número de genes asociados a cada proceso biológico según la base de datos, así como el número de genes evaluados en nuestra población para cada uno de estas vías.

	<i>Pancancer Significantly Mutated Genes</i>	Genes analizados en el estudio
Apoptosis	3	0
Ciclo celular	8	2
Modificadores de histonas de la cromatina	15	0
Otros procesos de la cromatina	14	0
Complejo SWI/SNF de la cromatina	8	1
Modificadores del ADN (Epigenética)	1	0
Integridad del genoma	14	2
Modificación de histonas	3	0
Señalización inmune	10	0
Señalización MAPK	9	5
Metabolismo	2	2
Señalización NFKB	2	0
Señalización NOTCH	1	1
Señalización PI3K	9	4
Homeostasis de proteínas/ubiquitinación	15	2
Abundancia de ARN	15	0
Señalización RTK	16	11
Corte y empalme (Splicing)	6	0
Señalización TGF- β	7	1
Señalización TOR	3	1
Factor de transcripción	39	2
Señalización Wnt/B-catenina	8	3
Otras señales	28	5
Otros	22	0

Tabla 23. Número de genes incluidos en cada proceso biológico asociado al cáncer según la base de datos *Pancancer Significantly Mutated Genes* y su representación en nuestra población de estudio (221).

El mapa de calor representado en la figura 37, proporciona una visión general de los genes analizados en nuestro estudio y que están incluidos en cada base de datos, destacando en rojo aquellos genes que presentan mutaciones patogénicas en este estudio. Los resultados revelan que, a diferencia de lo que pasaba con los *hallmarks*, aquí tampoco existe superposición de genes entre las distintas vías, aunque se mantiene una proporción considerable de los genes

analizados y alterados en nuestro estudio que no está presente en la base de datos, lo que resalta las limitaciones en la cobertura de la misma. Entre las mutaciones patogénicas de nuestra población que no se encuentran representadas en esta base de datos, destacan *ABL1*, *CSF1R*, *NOTCH2*, *NOTCH3* y *NOTCH4*.

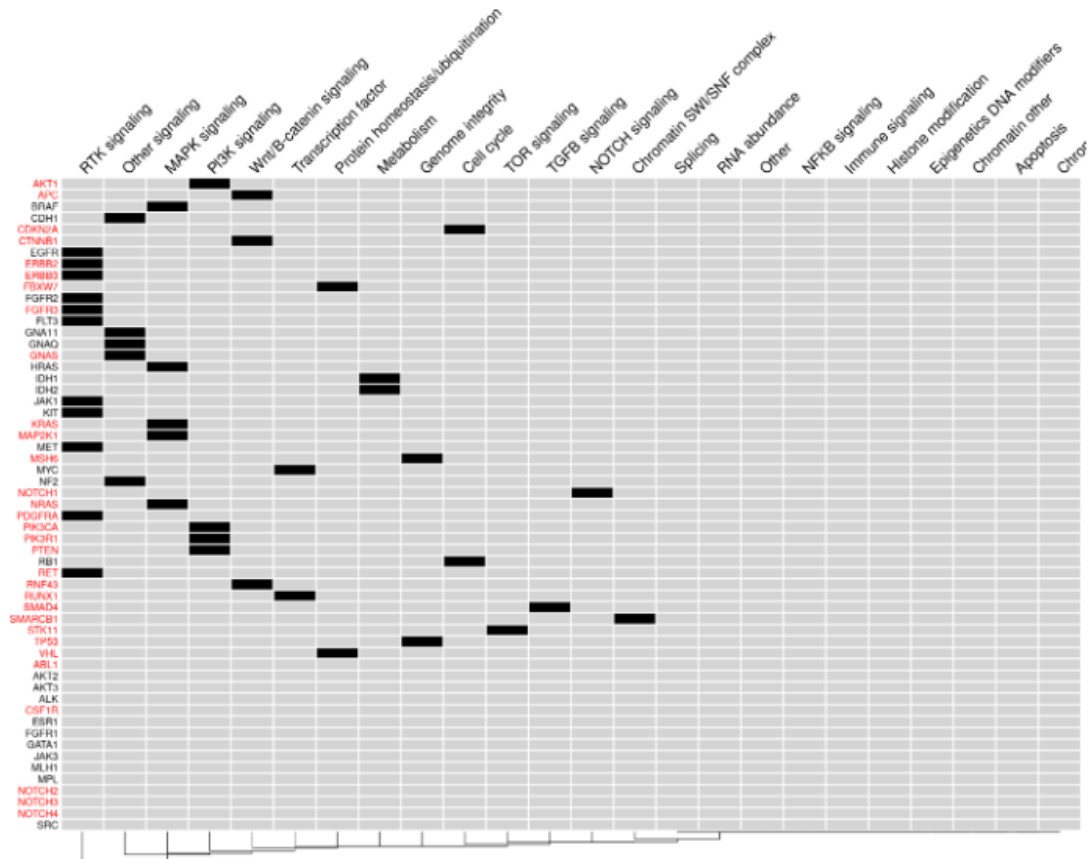


Figura 37. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada proceso biológico asociado al cáncer según *Pancancer Significantly Mutated Genes*. El mapa de calor proporciona una visión global de los genes analizados, resaltando en rojo aquellos con mutaciones patogénicas identificadas en nuestras muestras.

Para identificar diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de genes mutados por vía de señalización entre las distintas cohortes del estudio, se aplicó el test de Kruskal-Wallis de manera individual para cada vía presente en la base de datos *Oncogenic Signaling Pathways*. Se evaluó el número de genes mutados por muestra, agrupadas según la pertenencia a una de las tres cohortes del estudio. Los resultados obtenidos no revelaron diferencias significativas en el número de genes mutados por muestra entre las diversas vías de señalización intracelular (tabla 24).

	Comparación del número de genes mutados por muestra en cada grupo	
	P Valor	P Valor ajustado
Ciclo celular	0.59	0.65
Complejo SWI/SNF de la cromatina	0.11	0.47
Integridad del genoma	0.24	0.51
Señalización MAPK	0.11	0.47
Señalización NOTCH	0.42	0.51
Señalización PI3K	0.43	0.51
Homeostasis de proteínas/ubiquitinación	0.36	0.51
Señalización RTK	0.32	0.51
Señalización TGF- β	0.65	0.65
Señalización TOR	0.36	0.51
Factor de transcripción	0.32	0.51
Señalización Wnt/B-catenina	0.41	0.47
Otras señales	0.36	0.51

Tabla 24. Distribución de los genes evaluados y su asociación con cada proceso biológico asociado al cáncer según *Pancancer Significantly Mutated Genes*. Evaluación del número de genes mutados por muestra en cada proceso mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$, p ajustado < 0.25).

6.4. Contexto inmunológico del tumor asociado al patrón de diseminación

El contexto inmunológico tumoral se evaluó mediante VIGex en 129 pacientes de la población de estudio, distribuidos de la siguiente manera: 16 pacientes en el grupo A (12,4%), 75 en el grupo B (58,1%) y 38 en el grupo C (29,5%). Al examinar el porcentaje de pacientes con análisis de VIGex en cada grupo, se observa que este se realizó en el 7,8% de los pacientes del grupo A, el 11% del grupo B y el 12,8% del grupo C (figura 38). Es importante destacar que todas las determinaciones de VIGex se realizaron en el tumor primario para garantizar la homogeneidad de las muestras y evitar posibles sesgos derivados de la evaluación del contexto inmune en múltiples localizaciones metastásicas.

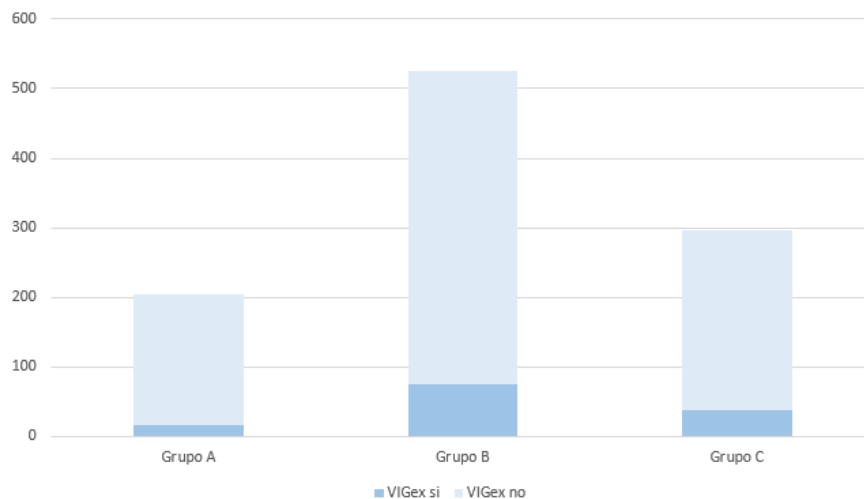


Figura 38. Proporción de pacientes con estudio VIGex realizado. Diagrama de barras que muestra el porcentaje de pacientes con estudio VIGex efectuado (azul oscuro) en comparación con los que no lo tienen (azul claro).

Las características de la población de estudio con análisis disponible de VIGex, así como las de cada grupo, se resumen en la tabla 25. En el total de la población, la mediana de edad es de 58 años, con una distribución de 44% de mujeres y 56% de hombres. El 39% de los tumores fueron clasificados como T4, y el 85% presentaron afectación ganglionar (N+). El 40% de los pacientes tenían tumores metacrónicos, aunque con una distribución desigual: 19% en el grupo A, 30% en el grupo B y 69% en el grupo C ($p < 0.001$). Además, el 19% de los pacientes de la población total presentaron tumores del lado derecho y un 19% tumores de recto, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Característica	Global, N = 129 ¹	Grupo A, N = 16 ¹	Grupo B, N = 75 ¹	Grupo C, N = 38 ¹	p-valor ²
Edad al diagnóstico (años)					0.8
Media (DE)	57 (12)	56 (10)	57 (12)	57 (13)	
Mediana (RIQ)	58 (50, 65)	55 (51, 61)	58 (50, 66)	60 (51, 65)	
Rango	22, 79	35, 74	30, 79	22, 79	
Género					0.3
Mujer	57 (44%)	9 (56%)	29 (39%)	19 (50%)	
Hombre	72 (56%)	7 (44%)	46 (61%)	19 (50%)	
Estadía T					>0.9
T1-3	59 (61%)	6 (55%)	31 (62%)	22 (61%)	
T4	38 (39%)	5 (45%)	19 (38%)	14 (39%)	
Estadía N					0.7
N0	15 (15%)	1 (8.3%)	7 (14%)	7 (19%)	
N+	82 (85%)	11 (92%)	42 (86%)	29 (81%)	
Sincrónico/Metacrónico					<0.001
Sincrónico	77 (60%)	13 (81%)	52 (70%)	12 (32%)	
Metacrónico	51 (40%)	3 (19%)	22 (30%)	26 (68%)	
Localización tumor primario					0.7
Derecho	24 (19%)	2 (13%)	17 (23%)	5 (13%)	
Izquierdo	72 (56%)	10 (67%)	41 (55%)	21 (55%)	
Recto	32 (25%)	3 (20%)	17 (23%)	12 (32%)	
Cirugía tumor primario					<0.001
No	36 (28%)	6 (38%)	28 (37%)	2 (5.3%)	
Sí	93 (72%)	10 (63%)	47 (63%)	36 (95%)	
Quimioterapia adyuvante					0.010
No	106 (82%)	14 (88%)	67 (89%)	25 (66%)	
Sí	23 (18%)	2 (13%)	8 (11%)	13 (34%)	
Seguimiento desde primera metástasis (meses)					0.7
Media (DE)	31 (18)	29 (12)	30 (17)	34 (22)	
Mediana (RIQ)	27 (19, 41)	29 (20, 35)	26 (19, 40)	28 (18, 42)	
Rango	1, 102	9, 56	1, 74	4, 102	

¹ n (%)

² test de Kruskal-Wallis; prueba chi cuadrado de independencia; test exacto de Fisher

Tabla 25. Características demográficas y clínicas de la población total y de las cohortes del estudio con análisis de VIGex disponible.

En cuanto a los resultados de VIGex en los tres grupos de estudio, estos se resumen en la tabla 26 y la figura 39. En el grupo A, se observa un 31% de tumores clasificados como *Hot*, un 56% como *iCold* y un 13% como *Cold*. En el grupo B, estos porcentajes fueron del 17% para tumores *Hot*, 61% *iCold* y 21% *Cold*. Finalmente, en el grupo C, se clasificaron como *Hot* el 21% de los tumores, 76% como *iCold* y 2,6% como *Cold*.

	Grupo			Total	p-valor ¹
	A	B	C		
Cluster Vigex					0.050
Cold	2 (13%)	16 (21%)	1 (2.6%)	19 (15%)	
iCold	9 (56%)	46 (61%)	29 (76%)	84 (65%)	
Hot	5 (31%)	13 (17%)	8 (21%)	26 (20%)	
Total	16 (100%)	75 (100%)	38 (100%)	129 (100%)	

¹ test exacto de Fisher

Tabla 26. Distribución de los resultados de VIGex en las diferentes cohortes del estudio.

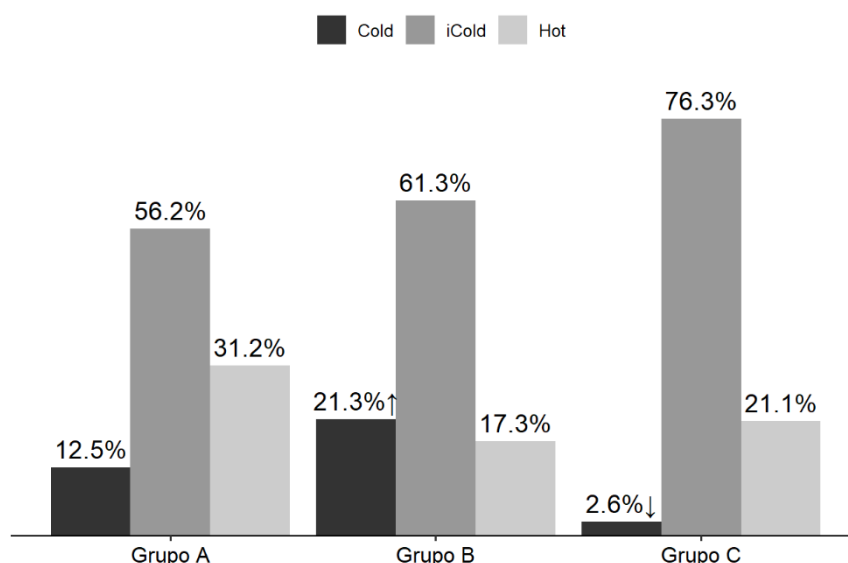


Figura 39. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex en las distintas cohortes del estudio. ($p=0.05$)

Ante los resultados obtenidos y observando que el patrón de distribución de los tumores *Cold* parece estar influido por la presencia de metástasis hepáticas, se decidió realizar un análisis agrupando los grupos A y B. Estos hallazgos, resumidos en la figura 40, confirman diferencias estadísticamente significativas en el patrón de tumores *Cold* entre las cohortes, siendo su presencia anecdótica en la cohorte C y observándose principalmente en los pacientes con metástasis hepáticas.

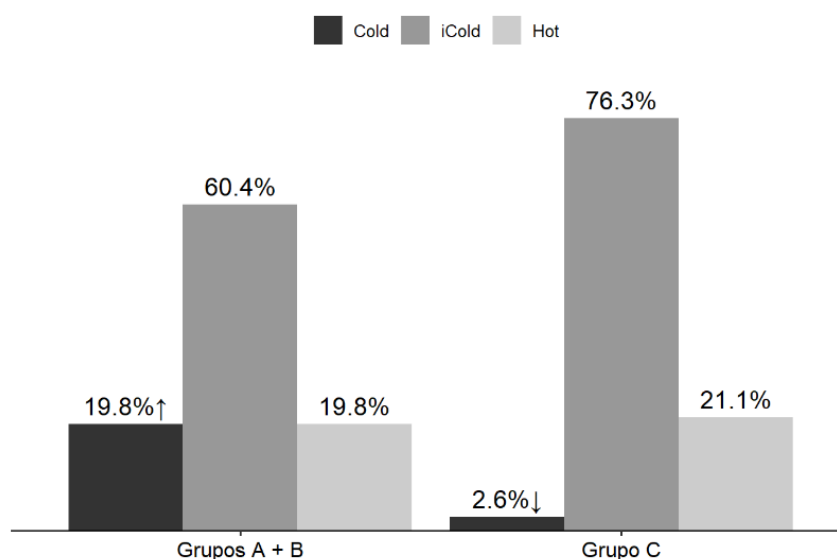


Figura 40. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex según la presencia o no de metástasis hepáticas. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el patrón de tumores de distribución de los tumores *Cold* ($p=0.041$).

Se realizó un análisis del perfil VIGex en función de la localización del tumor primario, diferenciando entre tumores de recto y tumores del resto del colon, como se muestra en la figura 41. No se observaron diferencias significativas en el perfil inmunológico entre ambas localizaciones. En la figura 42 se presenta la relación entre estas localizaciones y la presencia o ausencia de metástasis hepáticas. Es importante señalar que, en la cohorte C, solo se identificó un paciente con un tumor *cold* en el recto y ninguno con un tumor *cold* en el colon.

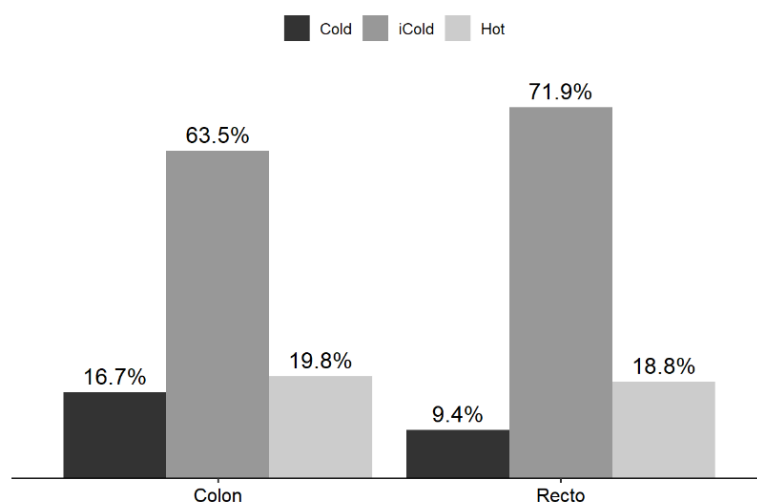


Figura 41. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex según la localización del tumor primario. No se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0.6$)

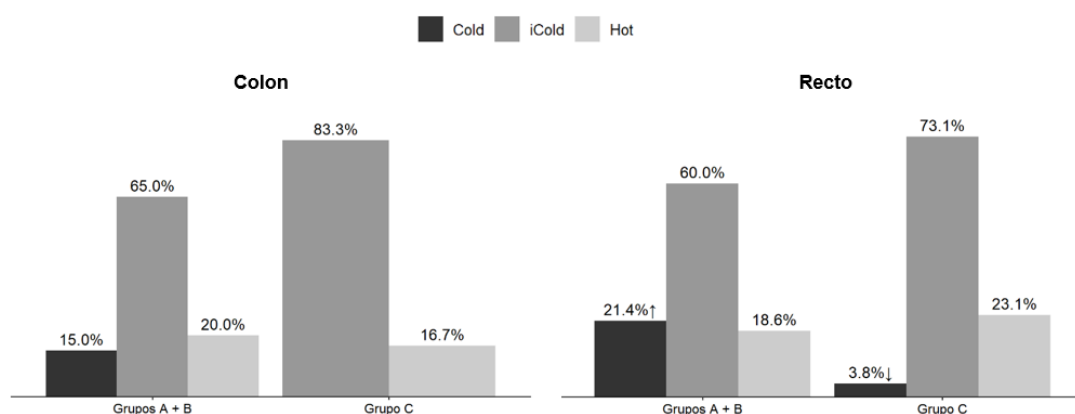


Figura 42. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex según la localización del tumor primario y en función de la presencia o no de afectación hepática. No se observan diferencias estadísticamente significativas en tumores de recto ($p=0.5$), destacando la ausencia de tumores *cold* en los pacientes con tumores de colon ($p=0.12$).

Finalmente, en la figura 43 se presenta el perfil de los tumores sincrónicos y metacrónicos en función de las tres cohortes de estudio. Destaca que en la cohorte A todos los tumores *cold* son de aparición sincrónica, mientras que en la cohorte B estos tumores *cold* se observan tanto en presentaciones sincrónicas como metacrónicas. En la cohorte C, el único caso de tumor *cold*, correspondiente a una metástasis metacrónica, no permite extraer conclusiones significativas, más allá de evidenciar la baja prevalencia de este subtipo inmunológico en pacientes sin metástasis hepáticas.

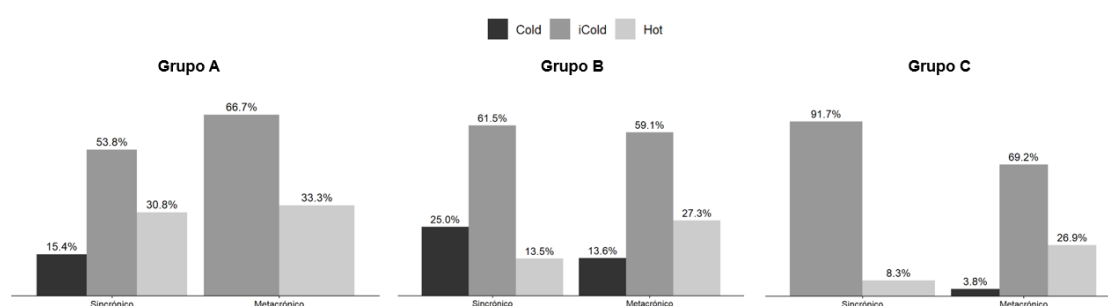


Figura 43. Representación gráfica de la distribución de los resultados de VIGex según la afectación metastásica sincrónica y metacrónica en cada cohorte. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes (cohorte A: $p > 0.9$; cohorte B: $p=0.3$; cohorte C: $p=0.4$).

6.5. Correlación entre el patrón de distribución de metástasis y la supervivencia

El análisis de la supervivencia global en la población de estudio muestra una ventaja en el Grupo C, con una mediana de 32 meses, en comparación con los 22 meses del Grupo A y los 24 meses del Grupo B ($p<0.001$), como se ilustra en la figura 44. En cuanto a los subgrupos B1, B2 y B3, hay una tendencia del subgrupo B3 a presentar mejor supervivencia (mediana de 23 meses), siendo el subgrupo B2 el que presenta peor supervivencia global, con una mediana de 16 meses (figura 45).

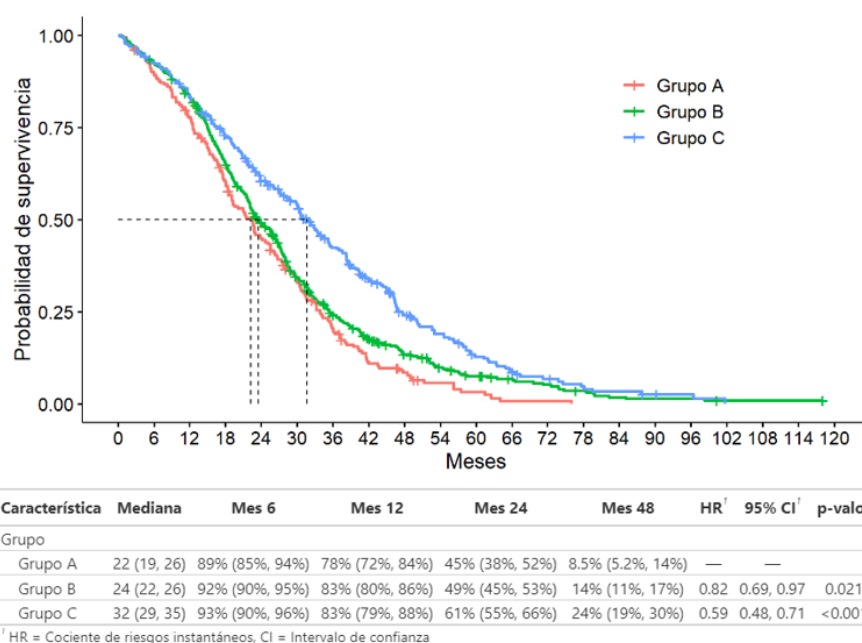


Figura 44. Supervivencia global por cohortes desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica. (Kaplan-Meier)

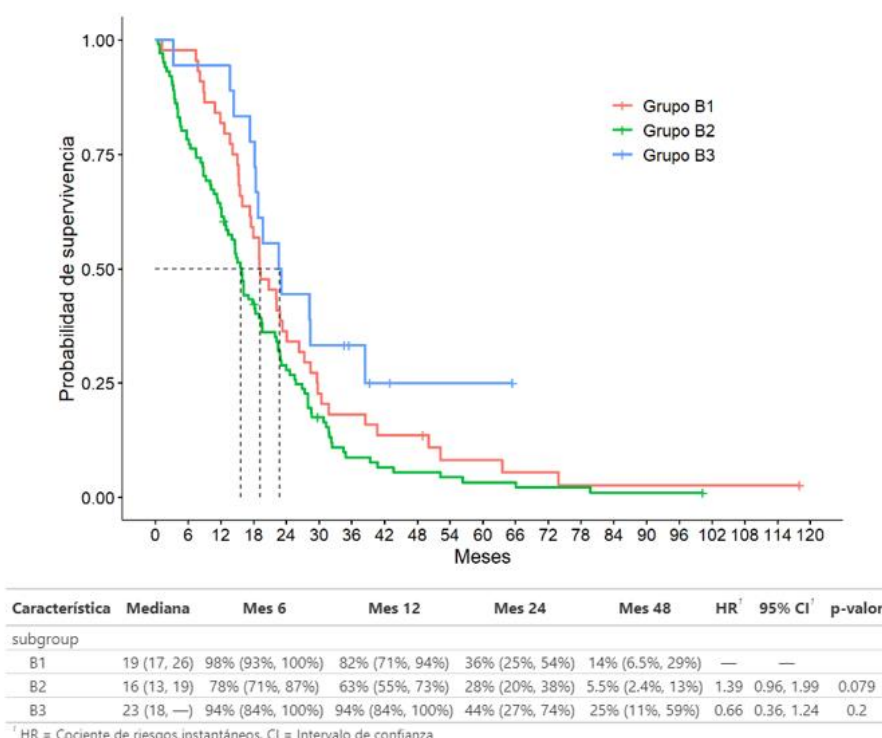


Figura 45. Supervivencia global por subgrupos desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica. El subgrupo B1 incluye pacientes con enfermedad hepática inicial que desarrollan enfermedad extrahepática posteriormente; B2, con afectación metastásica hepática y extrahepática al inicio; y B3, con afectación extrahepática inicial seguida de enfermedad hepática. (Kaplan-Meier).

Así mismo, destaca una mejor supervivencia para aquellos pacientes con tumores metacrónicos, alcanzando una mediana de supervivencia global de 29 meses, frente a los 24 meses de los tumores sincrónicos (figura 46).

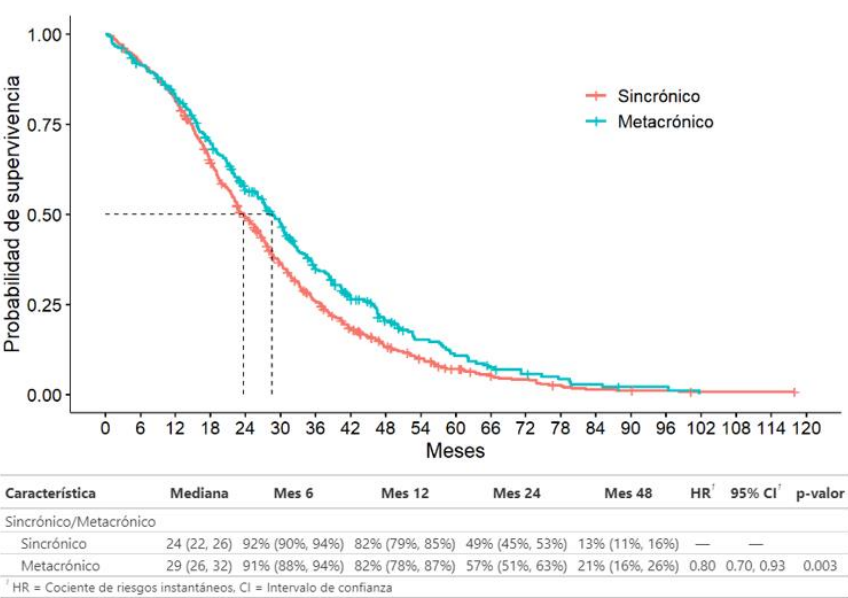
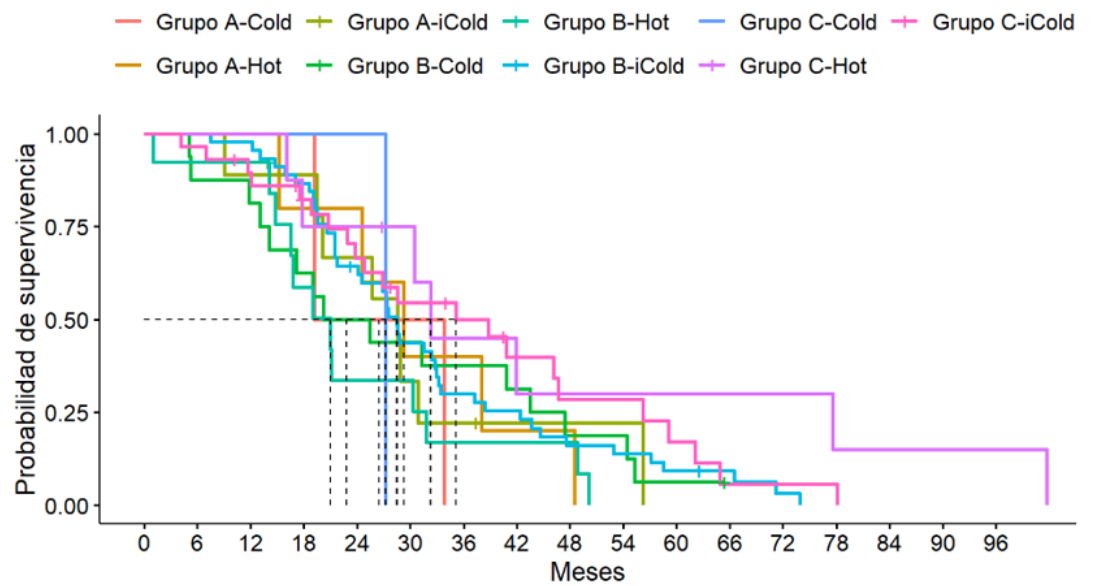


Figura 46. Supervivencia global según el momento de aparición de la enfermedad metastásica (sincrónica o metacrónica). (Kaplan-Meier)

Finalmente, al analizar el impacto de VIGex en la SG, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos subgrupos, lo cual podría atribuirse al número limitado de pacientes al dividir la muestra en múltiples subgrupos. Sin embargo, se aprecian tendencias clínicamente relevantes al comparar los 35 meses de SG en el grupo C *iCold* y los 32 meses en el grupo C *Hot*, frente a los 21 meses observados en el grupo B *Hot*. Los detalles de la evolución de cada cohorte según los resultados de VIGex se encuentran resumidos en la figura 47.



Característica	Mediana	Mes 6	Mes 12	Mes 24	Mes 48	HR [†]	95% CI [†]	p-valor
group_vigex								
Grupo A-Cold	27 (19, —)	100% (100%, 100%)	100% (100%, 100%)	50% (13%, 100%)	— (—, —)	—	—	
Grupo A-Hot	29 (25, —)	100% (100%, 100%)	100% (100%, 100%)	80% (52%, 100%)	20% (3.5%, 100%)	0.79	0.15, 4.09	0.8
Grupo A-iCold	29 (20, —)	100% (100%, 100%)	89% (71%, 100%)	67% (42%, 100%)	22% (6.5%, 75%)	0.79	0.17, 3.75	0.8
Grupo B-Cold	23 (14, 54)	88% (73%, 100%)	81% (64%, 100%)	50% (31%, 82%)	19% (6.8%, 52%)	0.76	0.17, 3.33	0.7
Grupo B-Hot	21 (17, —)	92% (79%, 100%)	92% (79%, 100%)	34% (15%, 75%)	17% (4.7%, 59%)	1.16	0.26, 5.20	0.8
Grupo B-iCold	29 (24, 33)	100% (100%, 100%)	98% (94%, 100%)	64% (52%, 80%)	16% (8.2%, 32%)	0.67	0.16, 2.80	0.6
Grupo C-Cold	27 (—, —)	100% (100%, 100%)	100% (100%, 100%)	100% (100%, 100%)	— (—, —)	1.11	0.10, 12.3	>0.9
Grupo C-Hot	32 (31, —)	100% (100%, 100%)	100% (100%, 100%)	75% (50%, 100%)	30% (9.5%, 94%)	0.31	0.06, 1.57	0.2
Grupo C-iCold	35 (25, 59)	97% (90%, 100%)	90% (79%, 100%)	67% (51%, 87%)	28% (14%, 57%)	0.50	0.12, 2.13	0.3

[†] HR = Cociente de riesgos instantáneos, CI = Intervalo de confianza

Figura 47. Supervivencia global por cohortes en función de los resultados de VIGex. (Kaplan-Meier)

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Este estudio analiza una cohorte de pacientes con CCRm irresecable con el propósito de identificar factores determinantes asociados a distintos patrones de diseminación metastásica. En particular, se pretende caracterizar las diferencias entre los pacientes con enfermedad exclusivamente hepática y aquellos con afectación extrahepática, con el fin de mejorar la estratificación y detección precoz de aquellos con mayor probabilidad de desarrollar una diseminación permanentemente limitada al hígado.

A continuación, se discuten las características más relevantes de la muestra analizada, los principales resultados obtenidos y su comparación con estudios recientes reportados en la literatura, junto con las limitaciones más destacadas del estudio.

7.1. Selección de la muestra

La muestra seleccionada incluyó inicialmente 1.263 pacientes con CCRm y enfermedad irresecable, diagnosticados en el Hospital Vall de Hebrón entre el 1 de enero de 2010 y el 31 de diciembre de 2019. La fecha de corte de los datos, establecida el 31 de diciembre de 2019, tuvo como objetivo garantizar un seguimiento mínimo de 3 años para los pacientes que seguían vivos en ese momento, con el fin de obtener una aproximación más precisa del patrón de diseminación acorde con los tres grupos considerados en el estudio. Si bien es cierto que el periodo de seguimiento se estableció arbitrariamente, su elección fue basado en los datos presentados por Ongaro y col. (209). En este estudio, se estableció que el riesgo acumulado de desarrollar enfermedad extrahepática en los primeros 3 años es del 65% (37% el primer año, 17% el segundo y 11% el tercero), mientras que disminuye a <4% más allá de los 3 años. Además, se tuvo en consideración que la mediana de SG de los pacientes con CCRm oscila entre 24 y 36 meses.

El estudio se centró exclusivamente en pacientes con enfermedad metastásica irresecable. La selección de esta población tenía como objetivo homogeneizar la

cohorte, facilitar la comprensión de la distribución metastásica a lo largo de la enfermedad y evitar los sesgos derivados del impacto de posibles intervenciones quirúrgicas. Este último punto se tuvo en consideración a raíz de los resultados del estudio previamente mencionado, donde Ongaro y col. confirmaron el impacto que tiene la resección de las metástasis hepáticas, especialmente cuando se realiza en una segunda intervención, en la SLP extrahepática (209).

El principal criterio de exclusión del estudio fue la presencia de mutaciones *BRAF*^{V600E} y/o MSI en el tumor. Esta decisión se basa en el hecho de que los pacientes con dichas alteraciones moleculares se correlacionan con un proceso de carcinogénesis específico asociado además a un patrón de diseminación y comportamiento metastásico particular. En primer lugar, el proceso de carcinogénesis asociado a estos subtipos moleculares diferente a la vía convencional. Mientras que un 65-70% de los CCR se originan a través de la vía de inestabilidad cromosómica, estos tumores lo realizan a través de la vía de MSI y/o de la vía del fenotipo metilador de islas GpC (20). Estas mutaciones, además, se asocian a una mayor frecuencia de diseminación peritoneal en comparación a aquellos pacientes sin dichas alteraciones moleculares (224,225). Recientemente se han publicado datos del Registro de Tratamiento del Cáncer Colorrectal Recurrente y Avanzado de Australia donde se evalúa el patrón de diseminación de debut de 4.613 pacientes con CCR tratados en múltiples centros australianos entre 2009 y 2023. De estos pacientes, 1.299 debutaron con enfermedad limitada al hígado, confirmándose en esta población una menor tasa de mutaciones *BRAF*^{V600E} (7.6 % vs. 14.3 %, $p < 0.001$) e MSI (2.8 % vs. 7.4 %, $p < 0.001$) comparados con otros patrones de diseminación (226). Así mismo, estos pacientes disponen de tratamientos específicos dirigidos que pueden también condicionar la evolución de la enfermedad. Por consiguiente, al ser consideradas como entidades distintas que requieren una aproximación específica y diferenciada, se decidió su exclusión del estudio.

Finalmente, se decidió dividir la población del estudio en tres cohortes en función de su patrón de diseminación: pacientes con enfermedad permanentemente limitada al hígado a lo largo de toda la enfermedad (Grupo A), pacientes con presencia tanto de enfermedad hepática y extrahepática (Grupo B) y pacientes con enfermedad exclusivamente extrahepática (Grupo C). Esta clasificación se

estableció con el objetivo de estudiar una población de pacientes que, a pesar de compartir un perfil molecular homogéneo basado en la carcinogénesis mediada por inestabilidad cromosómica y un mismo patrón circulatorio, muestran una notable variabilidad en la distribución de la enfermedad. Esta heterogeneidad en el comportamiento clínico sugiere que, aunque los tumores comparten mecanismos moleculares subyacentes, las vías de diseminación metastásica pueden estar influidas por factores adicionales, lo que subraya la importancia de estudiar estos patrones diferenciados para identificar posibles moduladores del comportamiento metastásico.

Si bien se consideró la posibilidad de agrupar la población en dos categorías amplias (enfermedad limitada permanentemente al hígado frente a patrones de diseminación alternativos), se optó por una clasificación en los tres patrones específicos previamente detallados. Esta decisión responde no solo a la relevancia clínica, como se argumentó exhaustivamente en la justificación de esta tesis, sino también a la necesidad de capturar y contrastar adecuadamente fenotipos extremos (Grupo A frente al Grupo C) y de analizar las posibles interrelaciones dentro del Grupo B, que representa un fenotipo mixto de afectación. Esta estrategia de clasificación permite un análisis detallado de las similitudes y diferencias en los patrones de distribución metastásica, facilitando así una caracterización más precisa y profunda de la heterogeneidad tumoral observada.

Desde una perspectiva clínica, la identificación de estos patrones de diseminación metastásica es fundamental, ya que su caracterización temprana puede ser clave para personalizar las estrategias terapéuticas. Diferentes patrones de diseminación pueden estar asociados con respuestas variables a las intervenciones terapéuticas, y reconocer de manera precoz estas entidades podría tener un impacto significativo en la toma de decisiones clínicas, mejorando los resultados para los pacientes a través de tratamientos más dirigidos y específicos, adaptados a la extensión y localización de su enfermedad metastásica (213).

7.2. Características clínicas y patológicas de la población del estudio

Las características de los pacientes incluidos en el estudio se asemejan a las de la población general afectada por CCRm. La edad promedio de los pacientes es de 63 años, que es algo inferior a la media de diagnóstico en los países occidentales, donde suele ser de 68 años para el cáncer de colon y de 62 años para el cáncer de recto (11). Este factor puede estar condicionado por el hecho de que el 60% de los pacientes de nuestra población son pacientes referidos de otros centros y además es especialmente frecuente la derivación de pacientes jóvenes para ser valorados para potencial inclusión en un ensayo clínico. En cuanto a la distribución por sexo, se observó una mayor prevalencia en hombres, un hallazgo que coincide con datos previos en los que la incidencia en mujeres es hasta un 30-40% menor según la región geográfica (2,11).

En relación con la localización del tumor primario, los datos obtenidos son consistentes con los de estudios publicados en el contexto de enfermedad metastásica. Se observa alrededor de un tercio de los pacientes con tumor primario ubicado en el colon derecho y dos tercios con tumores de colon izquierdo y recto (227).

Destacar, no obstante, que en nuestra población hay una menor presencia de tumores de recto (24%) en comparación con la incidencia esperada en nuestro país, que se sitúa en torno al 33% de acuerdo con los datos reportados por SEOM en el año 2023 (228). Remarcar, además, que se observa un enriquecimiento estadísticamente significativo de tumores rectales en el Grupo C (28% frente al 15% y 24% en los Grupos A y B, respectivamente). Este último fenómeno está probablemente condicionado por las diferencias en la circulación venosa que drena las distintas regiones del intestino. En este sentido, recordar que el recto posee un sistema de drenaje venoso dual que permite la diseminación de células tumorales tanto al hígado como a órganos distantes, como los pulmones, a diferencia del colon, cuyo drenaje es mayoritariamente portal y favorece la metastatización a nivel hepático. Esta diferencia explica la mayor propensión de los tumores de recto a desarrollar metástasis pulmonares en comparación con los tumores de colon (227). Así mismo, los pacientes con tumores de recto, tal y como hemos observado nuestro análisis, presentan con

mayor frecuencia enfermedad metastásica metacrónica, lo que implica una mayor probabilidad de ser candidatos a cirugía para el tratamiento de estas metástasis de comportamiento más indolente. Dado que en nuestra población de estudio se excluyeron los pacientes con cirugía de las metástasis, esta condición podría justificar el menor número de casos de tumores de recto observados en nuestra población en comparación con lo esperado.

En relación con la distribución metastásica, aproximadamente el 71% de los pacientes presentó metástasis hepáticas (19,9% en el Grupo A y 51,2% en el Grupo B), un porcentaje coherente con lo reportado en la literatura (227,229). Las referencias sobre pacientes con enfermedad permanentemente limitada al hígado son escasas. Entre ellas, destaca un estudio que analizó una cohorte de 225 pacientes con enfermedad hepática irresecable al diagnóstico, reportando que el 23% mantuvo la enfermedad confinada al hígado durante todo el transcurso de la enfermedad. Aunque este porcentaje supera ligeramente el 19,9% observado en nuestra serie, es relevante señalar que en la cohorte italiana hasta un 73% de los pacientes fueron posteriormente sometidos a cirugía hepática, pudiendo esta estrategia terapéutica influir en el patrón posterior de distribución metastásica (209). Recientemente, nuestro grupo, en colaboración con René Adam, llevó a cabo una revisión exhaustiva del patrón de recurrencia tras la cirugía de metástasis hepáticas en 33.581 pacientes incluidos en la base de datos *LiverMet Survey*. El análisis reveló que el 16% de los pacientes que presentaron recidiva tras la cirugía desarrollaron una enfermedad permanentemente confinada al hígado (210). Con estos datos, podemos concluir que el porcentaje observado en nuestra serie se encuentra dentro del rango de porcentajes reportados en estudios previos.

7.2.1. Enfermedad sincrónica vs. metacrónica

En relación con el porcentaje de tumores sincrónicos, este se sitúa alrededor del 68% en nuestra población. Este porcentaje es muy superior a los esperable en el global de la población con CCR, donde la incidencia de tumores sincrónicos se sitúa alrededor del 17-20% (230). Esta diferencia está claramente condicionada por el sesgo de selección de los pacientes del estudio, dado que

el estudio incluye exclusivamente a aquellos con enfermedad irresecable. En los pacientes con tumores metacrónicos, la probabilidad de someterse a cirugía para tratar la afectación metastásica es mayor en comparación con aquellos con enfermedad sincrónica. Como consecuencia, la exclusión de estos pacientes metacrónicos del estudio ha contribuido a las diferencias observadas en este aspecto (226).

No obstante, a pesar del enriquecimiento en pacientes con tumores sincrónicos, resulta llamativa la distribución desigual entre las cohortes del estudio, observándose diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con metástasis hepáticas y aquellos sin afectación hepática. En el Grupo A hubo un menor porcentaje de pacientes metacrónicos (15%) en comparación con el Grupo B (23%) y, de manera destacada, con el Grupo C (59%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.005$). Estas diferencias han sido también observadas en otras series publicadas en la literatura, siempre con tendencia a observar una asociación entre las metástasis hepáticas y los tumores sincrónicos (210,226,231). Aunque este fenómeno ya es conocido, los mecanismos moleculares subyacentes aún no han sido esclarecidos.

En este sentido, nuestro grupo ha presentado recientemente los datos del perfil molecular, diferenciando entre enfermedad metastásica sincrónica y metacrónica, sin encontrar diferencias genéticas significativas entre estos dos subgrupos de pacientes (232). Dado que no se ha identificado un perfil mutacional diferente entre ambas entidades, los próximos esfuerzos deberán enfocarse en el estudio del microambiente tumoral y la interacción entre el sistema inmunitario y el tumor como posibles factores determinantes de este fenómeno.

7.3. Características moleculares de la población de estudio

7.3.1. Perfil de mutaciones por cohortes del estudio

La disponibilidad de datos moleculares en una proporción significativa de la población de estudio resalta la importancia de maximizar el aprovechamiento de

la información accesible para abordar preguntas aún sin respuesta en la biología del CCRm. En un contexto en el que las tecnologías de NGS han revolucionado la caracterización molecular de los tumores, el acceso a grandes volúmenes de datos mutacionales representa una oportunidad única para la identificación de patrones genómicos con implicaciones biológicas y clínicas. En este sentido, la integración de información molecular ya disponible mediante enfoques analíticos robustos es un recurso fundamental para avanzar en el conocimiento de esta enfermedad y generar hipótesis que puedan ser validadas en estudios futuros.

En este estudio, se dispuso de datos moleculares de un total de 360 muestras de pacientes, lo que representa aproximadamente un tercio de la población total del estudio, con una distribución equitativa entre las tres cohortes evaluadas. La mayor parte de los datos, aproximadamente el 70%, se generaron mediante secuenciación con el test Amplicon, mientras que el resto corresponde al panel 300. Esta distribución está directamente relacionada con el periodo de inclusión de los pacientes, ya que entre 2010 e inicios del 2017 se empleó principalmente la tecnología de Amplicon, mientras que en los últimos tres años del estudio se utilizó el Panel VHIO card-300. Con el propósito de optimizar el tamaño muestra y garantizar la consistencia en los análisis comparativos, se procedió a la identificación y análisis de los genes compartidos entre ambas técnicas.

La mayoría de las muestras analizadas en este estudio provienen del tumor primario, siguiendo la práctica clínica habitual de realizar la caracterización molecular en el tejido más accesible y disponible desde el diagnóstico inicial. Estas muestras suelen obtenerse en etapas tempranas de la enfermedad y se consideran representativas del perfil molecular, dada la alta concordancia observada entre el tumor primario y las metástasis en CCR (233). Mutaciones clave en genes como *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* se han identificado consistentemente en ambas localizaciones (primario vs. metástasis), lo que justifica el uso del tumor primario para guiar decisiones terapéuticas, tal y como también recomiendan las guías clínicas (99).

El análisis final realizado abarcó un total de 57 genes combinados, de los cuales 31 presentaron mutaciones patogénicas. Como se observa en la figura 21, la distribución de los genes mutados entre las diferentes cohortes revela una

marcada superposición, lo que indica una cierta uniformidad molecular entre ellas.

Para esclarecer la 'carga' mutacional de cada cohorte de estudio, se decidió valorar el número de mutaciones por muestra y el número de genes mutados por muestra entre las 3 cohortes de estudio. En global, el número de mutaciones detectadas por muestra fue relativamente bajo, con una mediana de 2 a 3 mutaciones por muestra, resultados similares al número de genes mutados por muestra. Este bajo número de mutaciones puede atribuirse principalmente a varios factores. En primer lugar, los tumores hipermutados, asociados en su mayoría a MSI, han sido excluidos de la población de estudio. En segundo lugar, el análisis considera únicamente mutaciones patogénicas, excluyendo aquellas de significado incierto, lo que contribuye a la menor cantidad de mutaciones identificadas por muestra. Además, el análisis se basó en un panel de 57 genes diseñados para el cribado clínico, la 'carga' mutacional obtenida no es representativa del exoma completo, sino de un subconjunto de genes con relevancia oncológica, sin ser representa la totalidad de las alteraciones en el genoma tumoral.

A pesar del número de mutaciones relativamente bajo por muestra, hay que destacar que se observaron diferencias estadísticamente significativas que indican un mayor número tanto de mutaciones por muestra como de genes mutados en la cohorte B. Si bien no está claro cuáles son los motivos de dichas diferencias, una posible explicación podría ser la necesidad de adaptación de dichos tumores a múltiples órganos a distancia. Sin embargo, a pesar de que estas diferencias son estadísticamente significativas, ante la escasa magnitud de cambio son probablemente poco relevantes desde el punto de vista clínico.

Si analizamos gen por gen las mutaciones encontradas en nuestra población, destacan *APC*, *TP53* y *KRAS* como las tres más prevalentes en nuestra serie, un hallazgo que se alinea con lo descrito en la literatura (234). A modo de ejemplo, el perfil mutacional del cáncer de colon según el TCGA muestra que *APC* está mutado en aproximadamente el 80% de los casos, *TP53* en el 60%, *KRAS* en el 40%, *PIK3CA* en el 10-20% y *SMAD4* en el 10-15% (234). Estos

hallazgos coinciden con los resultados observados en nuestra población de estudio.

Aunque la distribución de mutaciones es, en general, homogénea entre las tres cohortes, se observa una mayor frecuencia de mutaciones en *APC* en la cohorte B y una menor frecuencia de mutaciones en *KRAS* en la cohorte A. Este último hallazgo coincide con estudios previos que sugieren que los pacientes con mutación en *KRAS* tienen una mayor probabilidad de desarrollar metástasis pulmonares durante el curso de la enfermedad (235–237). En cuanto a las mutaciones en *APC*, aunque no se han identificado diferencias claras en su prevalencia según la localización metastásica según los datos reportados en la literatura, su presencia se correlaciona con una mayor probabilidad de estar asociada a tumores de lado derecho y a un peor pronóstico (238,239). Es importante destacar nuevamente que, si bien estas diferencias en la prevalencia de *KRAS* y *APC* son estadísticamente significativas, la variación porcentual entre las cohortes no presenta implicaciones clínicas relevantes.

Con el fin de determinar una distribución específica de las mutaciones encontradas en cada cohorte del estudio, se realizó un análisis distributivo de las mutaciones detectadas según cada una de estas cohortes. En este análisis, no se observaron diferencias significativas en su distribución, tal y como se muestra en la figura 24. Asimismo, cuando las cohortes se agruparon en función de la presencia o ausencia de metástasis hepáticas o según si presentaban o no enfermedad extrahepática, tampoco se identificaron diferencias sustanciales en el perfil mutacional. Estos hallazgos sugieren que una falta de correlación molecular clara que permita distinguir entre los grupos, sugiriendo una homogeneidad subyacente en el perfil mutacional, independientemente de las características clínicas o metastásicas de cada cohorte. Al menos cuando analizamos, gen por gen, las mutaciones más comunes en CCR.

7.3.2. Análisis en función de agrupaciones de mutaciones

Con el objetivo de profundizar en la comprensión del proceso de diseminación tumoral, se realizaron distintos análisis para agrupar los patrones mutacionales

de las distintas muestras de cada cohorte. El propósito fue identificar posibles correlaciones entre conjunto de mutaciones y los diferentes patrones de diseminación. Para ello, se llevó a cabo la agrupación de dichas mutaciones en función distintos aspectos que se consideraron relevantes desde el punto de vista en el entendimiento molecular de esta enfermedad. En este sentido, se agruparon dichas mutaciones según los *hallmarks* del cáncer, según las vías de señalización más relevantes y, finalmente, de acuerdo con distintos procesos biológicos relacionados con la carcinogénesis, utilizando para ello los datos disponibles en distintas bases de datos previamente reportados en la literatura.

Es cierto que el estudio de mutaciones se centra en alteraciones estáticas del ADN y no refleja la funcionalidad de los genes mutados, como sí podría hacer el análisis de expresión génica, por ejemplo, que ofrece una visión dinámica del comportamiento celular en tiempo real. Este hecho limita la capacidad de nuestro estudio para capturar cómo los genes realmente influyen en los procesos biológicos, especialmente en respuesta a cambios en el microambiente tumoral, reduciendo así la precisión en la identificación de mecanismos clave y posibles dianas terapéuticas, aspecto que se comentará más ampliamente en el apartado de limitaciones del estudio. No obstante, se decidió realizar este análisis para poder explorar agrupaciones de mutaciones que permitan identificar dichos patrones de diseminación de una manera relativamente sencilla y que pudiera realizarse homogéneamente y ser fácilmente aplicable en la práctica clínica habitual.

A continuación, discutimos los hallazgos según cada uno de los análisis de agrupaciones de mutaciones realizados.

7.3.2.1. Agrupación en función de hallmarks del cáncer

La propuesta de agrupar las distintas mutaciones según los *hallmarks* del cáncer se fundamenta en el impacto significativo que estos han tenido en la evolución conceptual de la biología tumoral en las últimas décadas. Desde la publicación inicial en 2001 hasta las actualizaciones más recientes, los *hallmarks* han sido esenciales para delinear de forma clara las propiedades intrínsecas que

subyacen a la transformación maligna de las células tumorales, proporcionando un marco teórico robusto que facilita la interpretación de la complejidad del comportamiento neoplásico (222,223,240). Este enfoque no solo ha permitido comprender cómo las células tumorales adquieren ventajas adaptativas en su microambiente, sino que también ha servido como una base crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas.

Entre las bases de datos que agrupan los distintos genes en función de estos *hallmarks*, destacan el *Cancer Hallmark Genes*, que contempla 10 de estos *hallmarks*, y el *Cosmic Gene Consensus Hallmarks*, que contempla 14 (218,219).

Uno de los desafíos inherentes a estas bases de datos es que muchos genes están asociados simultáneamente a múltiples *hallmarks*, lo que complica aún más el entendimiento preciso del papel que desempeña cada gen en dichos procesos biológicos, un área que aún está en fase de exploración. Ante esta complejidad, en este trabajo se ha optado por analizar de manera separada dos bases de datos, e incluso, por combinar dichas fuentes con el fin de aportar mayor robustez a los resultados obtenidos. Sin embargo, uno de los problemas inherentes a nuestro estudio molecular es que los genes analizados no reflejan necesariamente el panorama biológico completo, sino que derivan de programas de *prescreening* para la inclusión de pacientes en ensayos clínicos, lo que limita el número de genes considerados. Esto genera, como se evidencia en las tablas 13 y 15, una cierta divergencia entre los genes detectados en nuestra muestra y aquellos asociados a los *hallmarks* según las bases de datos consultadas. Además, como se observa en las figuras 28 y 30, hay limitaciones relacionadas con genes de nuestras muestras que no se corresponden con ninguno de los *hallmarks* analizados.

En general, destaca que los pacientes del grupo B presentan una mayor asociación con determinados *hallmarks* del cáncer, como la activación de invasión y metástasis, la resistencia a la muerte celular, la evasión de señales de crecimiento, el mantenimiento de señales proliferativas y la capacidad replicativa inmortal, especialmente en comparación con la cohorte A. Estos hallazgos sugieren que las células tumorales en el grupo B podrían requerir una alteración más profunda de ciertos *hallmarks* en función de una mayor capacidad

para afectar múltiples órganos, lo que se refleja en el perfil clínico más avanzado de esta cohorte. Por otro lado, el análisis general no revela un enriquecimiento significativo de estos *hallmarks* en la cohorte de interés de nuestro estudio, la cohorte A, lo que complica su identificación anticipada mediante esta estrategia de agrupación molecular, sugiriendo que este enfoque puede no ser suficiente para capturar las alteraciones clave en esta población específica.

7.3.2.2. Agrupación en función de vías de señalización

Otra aproximación interesante es realizar dicha agrupación de genes en función de vías de señalización. La clasificación por vías de señalización aporta una perspectiva más precisa y detallada sobre los mecanismos moleculares que subyacen en el comportamiento tumoral. Mientras que los *hallmarks* del cáncer ofrecen un marco amplio y conceptual, el enfoque en las vías de señalización permite un entendimiento más profundo de las interacciones celulares específicas, lo que facilita la identificación de alteraciones clave con un mayor potencial para desarrollar terapias dirigidas.

En la figura 35, se evidencia claramente que cada uno de los genes analizados puede atribuirse a múltiples vías de señalización. Sin embargo, en nuestra muestra se observa un marcado enriquecimiento de genes asociados a la vía MAPK, mientras que otras vías están escasamente representadas o incluso ausentes. Además, dado que los genes analizados provienen de programas de cribado, existe un porcentaje significativo de genes que no se asocian con ninguna de las vías establecidas en la base de datos seleccionada, la *Oncogenic Signaling Pathways*, lo que limita en parte los resultados obtenidos en este análisis.

En términos generales, no se observan diferencias significativas entre las distintas vías de señalización analizadas, con la excepción de la vía WNT, que muestra un enriquecimiento marcado en la cohorte B cuando analizamos únicamente a los pacientes con el VHIO card-300. Este hallazgo se fundamenta básicamente en el mayor número de mutaciones de *APC* en este grupo de pacientes tal y como se revisaba el apartado anterior. Si bien es cierto que dichos

hallazgos deberán ser confirmados en cohortes de validación, considerando la magnitud de esta diferencia, su relevancia clínica es limitada, ya que no conlleva implicaciones significativas en términos de manejo terapéutico.

7.3.2.3. Agrupación en función de procesos biológicos

Otra aproximación de interés es la agrupación por procesos biológicos. Mientras que la clasificación por *hallmarks* se centra en las características adquiridas por las células cancerosas que les confieren ventajas selectivas, la clasificación por procesos biológicos se enfoca en las funciones celulares específicas que son alteradas por las mutaciones, ofreciendo perspectivas complementarias para la comprensión y el tratamiento del cáncer.

Para realizar este análisis, hemos comparado los resultados de nuestras muestras con los datos de la base de *Pancancer Significantly Mutated Genes*, derivada de las cohortes del TCGA. Esta base de datos tiene como punto fuerte a su favor el hecho de que constituye el análisis más extenso hasta la fecha para identificar genes impulsores del cáncer, empleando uno de los conjuntos de datos genómicos más completos disponibles (TCGA). Se identificaron 299 genes impulsores específicos, aunque hay que destacar que el enfoque está limitado al análisis de mutaciones puntuales e indels pequeños, sin incluir variaciones en el número de copias, fusiones genómicas o eventos de metilación.

Sin embargo, la principal dificultad de este estudio para agrupar las mutaciones encontradas en procesos biológicos radica en la complejidad de los sistemas celulares y en cómo estas mutaciones afectan múltiples rutas y funciones de manera interconectada. Dado que muchas mutaciones no se limitan a un solo proceso biológico, sino que influyen en múltiples funciones celulares simultáneamente (por ejemplo, señalización, reparación del ADN y ciclo celular), categorizar cada mutación en un solo proceso puede llevar a una simplificación excesiva que no refleje adecuadamente la realidad biológica. Además, las mutaciones pueden variar en sus efectos según el contexto celular y el tipo de cáncer, lo cual agrega otra capa de dificultad para su clasificación. Este fenómeno se observa si analizamos los distintos procesos que propone

Pancancer Significantly Mutated Genes, con grupos similares entre ellos como 3 grupos relacionados con la regulación de la cromatina o dos grupos clasificados como “otros”.

A pesar de estas limitaciones, el análisis se realizó con el objetivo de identificar algún proceso biológico enriquecido en ciertos grupos que pudiera tener relevancia clínica. Sin embargo, los resultados están restringidos por el bajo número de genes asociados a los distintos procesos biológicos en nuestra muestra. En muchos casos, ni siquiera se detectaron genes en estos procesos, lo cual limita nuestra capacidad para identificar patrones claros o establecer asociaciones robustas. En consecuencia, no fue posible asociar ninguno de estos procesos biológicos con las cohortes de nuestro estudio, reduciendo el potencial para extraer conclusiones significativas en este contexto.

7.4. Determinación de VIGex en la población de estudio

Como se mencionó en el apartado anterior, una de las limitaciones de analizar únicamente las mutaciones detectadas radica en la falta de consideración del contexto inmunológico asociado al tumor. Para explorar este aspecto, se analizaron 129 muestras de tumores primarios disponibles en los pacientes de nuestra población de estudio.

Los resultados obtenidos revelan una diferencia notable en la frecuencia de tumores *Cold* entre las cohortes analizadas: estos son significativamente menos comunes en los casos sin metástasis hepáticas (2.6%) en comparación con aquellos que presentan metástasis hepáticas (19.8%), como se muestra en la figura 39. Esta diferencia sugiere una posible asociación entre el estado inmunológico del tumor primario y la presencia de metástasis hepáticas, abriendo una vía para futuras investigaciones sobre el papel del microambiente inmunitario en la diseminación metastásica.

Este hallazgo es particularmente relevante en el contexto actual, donde el patrón de distribución en el CCR, diferenciado por la presencia o ausencia de metástasis hepáticas, ha suscitado un creciente interés respecto al impacto en

la respuesta a la inmunoterapia. En el CCRm, el tratamiento con inmunoterapia ha demostrado una eficacia notable únicamente en el subgrupo de tumor con alta MSI, que se caracterizan por una elevada carga mutacional que genera neoantígenos inmunogénicos que facilita una mayor visibilidad del tumor para el sistema inmunológico. No obstante, estos casos representan solo alrededor del 5% de todos los CCRm, limitando significativamente el alcance de los beneficios de la inmunoterapia en esta enfermedad (241). La gran mayoría de los CCRm son tumores sin MSI, con un microambiente tumoral menos reactivo con una carga mutacional más baja, reduciendo así su inmunogenicidad. En consecuencia, la mayoría de las estrategias con basadas en inmunoterapia en estos tumores no han alcanzado los resultados esperados (242).

Recientemente, múltiples ensayos clínicos han demostrado que los pacientes con CCRm sin metástasis hepáticas muestran tasas de respuesta significativamente mayores y una SLP más prolongada en comparación con aquellos con metástasis hepáticas (75,76). Este fenómeno sugiere que las metástasis hepáticas pueden inducir una inhibición de la inmunidad antitumoral y una mayor tolerancia inmunitaria, facilitada por un microambiente tumoral rico en TGF- β , con menor expresión de células T CD4 y CD8, activación de macrófagos hepáticos de tipo 1, y un aumento de células inmunosupresoras (77,243,244). Este ambiente inmunotolerante no solo afecta la respuesta a la inmunoterapia, sino que también juega un papel crucial en la colonización y crecimiento de las metástasis en el hígado. En contraste, otros sitios metastásicos, como los pulmones o el peritoneo, presentan un microambiente menos inmunotolerante, con una mayor actividad de células inmunitarias efectivas, lo que puede limitar la capacidad del tumor para establecerse y proliferar en estos órganos (245).

Nuestros hallazgos, basados en el análisis del tumor primario, sugieren que la interacción entre el sistema inmunológico y el tumor desempeña un papel fundamental en la distribución y el patrón de diseminación del CCR. Esta influencia del tumor primario podría deberse a su capacidad para moldear el microambiente inmunológico desde etapas tempranas, lo cual impactaría en las rutas y destinos de la diseminación en fases avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, no se puede descartar el papel modulador del hígado en todo este

proceso, un aspecto que requiere un estudio más detallado para clarificar su impacto en la progresión y distribución metastásica en fases precoces de la enfermedad.

Un aspecto a considerar es el posible impacto de la localización del tumor primario en la interpretación de los resultados. Es importante recordar que la cohorte C presenta un mayor porcentaje de tumores de recto (32%) en comparación con los grupos A y B (20% y 23%, respectivamente). Existe la posibilidad de que los tumores de recto y colon presenten un perfil inmunológico e inflamatorio diferencial. Esta variación podría deberse, entre otros factores, a las características intrínsecas del tumor según su localización primaria (87). Además, los tumores de recto a menudo reciben tratamiento neoadyuvante con radioterapia, lo que puede modificar el perfil inflamatorio y la respuesta inmunológica del tumor, debido a los cambios que la radioterapia induce en el microambiente tumoral (246). Por tanto, comprender estas diferencias es clave para interpretar adecuadamente el impacto del microambiente inmunológico en cada localización tumoral.

Para evaluar este impacto, se realizaron los estudios presentados en las figuras 40 y 41, donde se observa un patrón similar en los resultados de VIGex al comparar tumores de colon con tumores de recto. Un hallazgo llamativo es que todos los tumores de colon clasificados como *cold* según VIGex presentan metástasis hepáticas (cohorte A + B), sin que ninguno de estos tumores *cold* esté asociado con metástasis en otros órganos exclusivamente (cohorte C). Este fenómeno podría respaldar el papel del hígado como modulador inmunológico en relación con el tumor primario, lo cual plantea una hipótesis que requiere confirmación mediante estudios futuros.

De hecho, este aspecto es particularmente interesante. Aunque el objetivo inicial de nuestro estudio era caracterizar a los pacientes con enfermedad permanentemente limitada al hígado, los hallazgos sobre el contexto inmune en pacientes sin enfermedad hepática son relevantes y merecen una mención específica.

En la literatura, los pacientes con tumores MSI presentan un patrón de diseminación distinto al de otros cánceres de colon, lo cual se atribuye a su alto número de mutaciones y a un contexto inmunológico más *hot*. En estudios recientes sobre inmunoterapia para tumores con MSI, el porcentaje de pacientes con metástasis hepáticas es considerablemente menor al esperado para el CCRm en general, que suele mostrar aproximadamente un 70-75% de metástasis hepáticas. Por ejemplo, en el estudio Keynote 177, solo el 40.7% de los pacientes presentaban M1 hepáticas; en el estudio CheckMate 8HW, este porcentaje fue de 26.4% (considerando las cohortes de Nivolumab + Ipilimumab y quimioterapia), y en el estudio de fase II CheckMate 142, fue del 36% (247–249). Estos datos van en línea con la observación de que los tumores con metástasis hepáticas tienden a presentar un perfil inmunológico más *cold*, lo que sugiere que el microambiente inmunológico de los tumores podría influir en su patrón de diseminación, tal como se ha observado en nuestra población de estudio.

La literatura también describe que el órgano diana desempeña un papel crucial en la progresión de las metástasis. Un estudio reciente examinó cómo el microambiente inmunológico de distintos órganos influye en el crecimiento de células metastásicas, analizando 374 muestras de metástasis de tumores primarios como cáncer de mama, colorrectal, renal y melanoma, en localizaciones secundarias como cerebro, hueso, hígado y pulmón. Las metástasis en el pulmón presentaron perfiles inmunológicos significativamente más elevados y un fenotipo inflamatorio, con mayor expresión de PD-L1, CTLA4 y genes asociados a la respuesta a bloqueo de PD-1, en comparación con las metástasis en cerebro, hígado y hueso (245). Estos resultados sugieren que el pulmón, como sitio metastásico, podría estar particularmente influido por factores inmunológicos, hallazgos que van en consonancia con los obtenidos en nuestro análisis.

Finalmente, resulta relevante resaltar la influencia del contexto inmunológico en la aparición sincrónica o metacrónica de la enfermedad, tal como se esquematiza en la figura 42. En la cohorte A, ningún paciente con enfermedad metacrónica presenta un perfil de tumor *cold*, mientras que en la cohorte B estos tumores están presentes tanto en casos sincrónicos como metacrónicos. En el grupo C,

solo un paciente muestra un tumor *cold*, lo cual limita la posibilidad de extraer conclusiones firmes, aunque este subtipo parece estar poco representado en esta cohorte.

El concepto de "inmunodivergencia" en el CCRm, propuesto por el grupo de Ignacio Melero, describe cómo el sistema inmunológico influye en la evolución tumoral y en la aparición de metástasis sincrónicas o metacrónicas (250). Esta idea se basa en los estudios de Jerome Galon, que demuestran que una alta infiltración de células T en los tumores primarios de cáncer de colon se asocia con una menor probabilidad de desarrollar metástasis tras la cirugía. Sin embargo, en las lesiones metastásicas, aunque la infiltración de células T sigue teniendo valor pronóstico, su precisión es menor que en el tumor primario (251). Este proceso de coevolución entre el cáncer y la respuesta inmune determina el número, tamaño y progresión de las metástasis, marcando una diferencia entre aquellas de aparición sincrónica y metacrónica. Así, el fenómeno de inmunodivergencia refleja un historial de vigilancia y escape inmunológico que contribuye a la heterogeneidad entre pacientes y lesiones.

Estos hallazgos sugieren que el microambiente inmunológico del tumor primario podría influir en el momento y la localización de la diseminación metastásica en el cáncer colorrectal. No obstante, es importante señalar que la evidencia actual es limitada, y se requieren estudios adicionales para establecer conclusiones definitivas sobre esta asociación.

En nuestro estudio la determinación del contexto inflamatorio de un tumor se determina mediante la firma de expresión génica desarrollada en el VHIO denominada VIGex (217). Inicialmente diseñada como una herramienta predictiva para evaluar la respuesta a la inmunoterapia, VIGex también ofrece la posibilidad de explorar la interrelación entre el patrón de diseminación tumoral y la interacción del tumor con el sistema inmunitario del huésped. Existen otras herramientas que han explorado esta interacción, como el Immunoscore, que cuantifica la densidad de células T infiltrantes (CD3+ y CD8+) en el tumor y su microambiente, proporcionando una medida del estado de inmunovigilancia y permitiendo una estratificación más precisa del riesgo de recurrencia en pacientes con CCR (252). Si bien el Immunoscore es una metodología validada

y eficaz, VIGex presenta ciertas ventajas, como su desarrollo interno en VHIO, lo que lo hace más accesible y adaptado a nuestro entorno clínico y de investigación, permitiendo su implementación con mayor agilidad y relevancia.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que la realización del VIGex se ha llevado a cabo en un contexto de validación técnica y en una población seleccionada de candidatos potenciales a ser incluidos en ensayos clínicos en nuestra institución. Esto podría haber influido en las características de la población del estudio con resultados disponibles de VIGex, especialmente en términos de la mediana de edad, que en nuestra cohorte se sitúa en 58 años, y que reflejaría una población más joven que la mediana de edad esperada para esta enfermedad. Además, este sesgo de selección, inherente a su aplicación en un contexto de investigación, ha dado lugar a una menor representación de tumores del lado derecho y a una mayor presencia de tumores del lado izquierdo. Esta última tendencia podría reflejar una selección de tumores con una evolución más favorable, que suelen llegar a situación de refractariedad al tratamiento estándar en mejores condiciones para ser candidatos a ensayos clínicos, escenario donde la determinación de VIGex ha sido realizada. Finalmente, aunque el porcentaje de pacientes con análisis mediante VIGex es relativamente similar entre las cohortes, el número total de pacientes incluidos en este análisis es reducido, con solo 16 pacientes en la cohorte A, lo que limita la capacidad de alcanzar un poder estadístico adecuado para realizar conclusiones robustas.

Entre otras limitaciones de esta herramienta se destaca su enfoque basado exclusivamente en el análisis del tumor primario, lo que podría no representar completamente el estado inmunológico de las metástasis. De hecho, si bien se ha mencionado que el perfil de mutaciones es similar entre el tumor primario y la afectación metastásica, estas similitudes no son tan evidente si se analiza el perfil de expresión génica. En la introducción se mencionan los hallazgos de Pitroda y colaboradores, que observaron la presencia de patrones CMS2 y CMS4 en el 62% y el 12% de las metástasis hepática con una notable ausencia de los patrones CMS1 (1%) y CMS3 (0%), lo que contrasta con lo reportado al realizar dicho análisis en el tumor primario (91). Esto está en consonancia con el papel que el microambiente tumoral puede ejercer en el perfil de expresión génica de estos pacientes, y debe ser considerado en estudios posteriores.

Además, otro de los problemas de la categorización del VIGex en tres tipos de respuesta (*Hot*, *I-Cold* y *Cold*) implicaría el hecho de no capturar adecuadamente la heterogeneidad tumoral, especialmente dado el elevado porcentaje de tumores clasificados como *I-Cold*, que se observa en el 65% de los pacientes analizados. Finalmente, cabe resaltar la presencia de un 20% de tumores clasificados como *Hot*, un hallazgo significativo en una población en la que todos los tumores presentan estabilidad de microsatélites. Este hecho podría ser clave para identificar nuevos candidatos a tratamientos basados en inmunoterapia, lo que subraya la necesidad de estudiar más a fondo su potencial como biomarcador.

7.5. Correlación con supervivencia global

La mediana de SG en las cohortes de estudio varía entre 22 meses en la cohorte A hasta los 32 meses observados en la corte C, lo cual es coherente con los datos esperados para una población con CCRm irresecable (253). Así mismos, las diferencias observadas en a favor de la cohorte C, cohorte sin presencia de metástasis hepáticas, concuerdan también con los datos publicados en la literatura (254,255).

Las diferencias de SG encontradas entre las cohortes pueden resultar llamativas si consideramos los criterios de inclusión y exclusión de nuestro estudio, que dan lugar a una población homogénea en términos de carcinogénesis, predominando la vía de inestabilidad cromosómica. Así mismo, el análisis molecular realizado muestra que no hay diferencias significativas en la distribución de mutaciones entre las cohortes, lo que sugiere que el perfil mutacional por sí solo no explica las diferencias observadas en el patrón de diseminación metastásica. Esto sugiere que las diferencias de supervivencia se deben a otros factores relevantes.

Uno de estos factores, identificado en nuestro análisis del contexto inmunológico del tumor, es la interacción del sistema inmunitario con el microambiente tumoral. En el hígado, el microambiente se caracteriza por una inmunotolerancia elevada, facilitada por la presencia de células inmunosupresoras, como los macrófagos

tipo M2, y la producción de citocinas como TGF- β , que inhiben la respuesta inmune local y favorecen la evasión inmunológica y la supervivencia de las células tumorales. En contraste, otros sitios metastásicos, como los pulmones o el peritoneo, tienen un microambiente menos inmunotolerante, con una mayor actividad de células inmunitarias efectivas, lo que puede limitar la capacidad del tumor para establecerse y proliferar, afectando así la progresión de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos. Estas diferencias se observan cuando se realizan los análisis de SG en función del VIGex según cada cohorte, así como en el análisis de la metástasis según su presentación sincrónica o metacrónica, la cual, como se ha mencionado anteriormente, podría estar relacionada con el fenómeno de inmunodivergencia, y el equilibrio entre la vigilancia y escape inmunológico del tumor.

Estos hallazgos subrayan, de nuevo, la necesidad de investigaciones adicionales para dilucidar cómo estas interacciones inmunológicas afectan la diseminación tumoral y contribuyen a las diferencias en los resultados clínicos observados.

7.6. Principales limitaciones del estudio

Existen importantes limitaciones que deben considerarse en este estudio, algunas de las cuales, si bien se han discutido a lo largo de las secciones anteriores, se sintetizan y amplían a continuación.

En primer lugar, la naturaleza retrospectiva del estudio conlleva una serie de limitaciones inherentes. Una de las más relevantes es que los datos no fueron recolectados con el propósito específico de abordar las preguntas planteadas en el estudio actual, lo que puede afectar tanto la calidad de los datos como su consistencia temporal. La falta de control sobre la recolección de datos y los criterios de inclusión utilizados introduce un posible sesgo de selección, lo cual puede alterar la representatividad de los resultados. Este problema es particularmente relevante cuando se considera aquellos pacientes con análisis molecular o análisis de VIGex disponible, ya que el criterio para la realización de estos estudios fue inicialmente dirigido hacia la selección de posibles candidatos

para ensayos clínicos, en lugar de centrarse en la caracterización del perfil de diseminación metastásica. Este enfoque inicial puede haber generado un sesgo de selección implícito, dado que la población estudiada podría no reflejar de manera precisa la diversidad de los pacientes con metástasis, lo que limita la extrapolación de los hallazgos.

El estudio molecular llevado a cabo representa, probablemente, una de las principales limitaciones del estudio. En primer lugar, existe un claro sesgo de selección, ya que las herramientas empleadas están diseñadas principalmente para la selección de pacientes candidatos a ensayos clínicos, sin un enfoque específico hacia la biología tumoral. Esto condiciona que la interpretación del perfil molecular obtenido y su correlación con distintos procesos biológicos o *hallmarks* del cáncer sea especialmente compleja.

Desde un punto de vista técnico, la limitación de centrarse exclusivamente en mutaciones genéticas es especialmente relevante. En primer lugar, en este estudio solo se han incluido las mutaciones patogénicas, excluyendo las variantes de significado incierto. Aunque esto mejora la precisión de los resultados, la exclusión de estas otras variantes podría limitar la identificación de alteraciones genéticas que, aunque no estén claramente caracterizadas como patogénicas, podrían ser relevantes para la biología tumoral y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, si bien las mutaciones proporcionan información valiosa sobre posibles alteraciones genómicas, no capturan el comportamiento funcional del tumor. Las mutaciones ofrecen una visión estática del genoma, pero no permiten inferir cómo esos genes mutados afectan la función celular de forma dinámica. Es cierto que el objetivo inicial era utilizar datos fácilmente obtenibles y aplicables en la práctica clínica; sin embargo, probablemente sea necesario ampliar nuestro estudio con resultados de RNA-seq, ya que proporcionan una visión más completa y precisa sobre el estado funcional de los genes.

En este sentido, el análisis basado en expresión génica ofrece una visión más dinámica del estado molecular del tumor, reflejando tanto la actividad de las vías de señalización clave como la respuesta del microambiente tumoral. Además, este enfoque incluye indirectamente el impacto de mecanismos de regulación

epigenética, ya que las modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN o las modificaciones de histonas, pueden regular la expresión de genes sin alterar su secuencia genética. De este modo, los estudios de expresión génica capturan también la influencia de estos mecanismos epigenéticos que modulan la activación o silenciamiento de genes, proporcionando una imagen más funcional del comportamiento tumoral. No obstante, aunque el análisis de expresión génica ofrece una comprensión más profunda y precisa de la biología molecular asociada a los distintos patrones de distribución metastásica en el CCR, se optó por realizar primero una caracterización inicial basada en el perfil de mutaciones encontradas. Esta aproximación permite un primer acercamiento a los patrones de diseminación, que podrá complementarse con un análisis de expresión génica en etapas posteriores para obtener una visión más detallada.

Es fundamental considerar, al analizar los *hallmarks* o procesos biológicos, la diversidad y heterogeneidad de las bases de datos disponibles en relación con la asociación de las mutaciones encontradas y su rol en la carcinogénesis. Muchas de estas mutaciones están implicadas en múltiples procesos, lo que dificulta establecer una vinculación precisa con funciones específicas. Para nuestro análisis, hemos empleado las principales bases de datos con información sólida y validada, aunque reconocemos la existencia de otras fuentes igualmente válidas que también podrían ser consideradas en futuros estudios para ampliar la interpretación de los resultados.

En este punto, es interesante destacar la siguiente reflexión que planteaba Ottoiano en una revisión reciente (256). Esta revisión destaca la dificultad de establecer correlaciones genotipo-fenotipo en el cáncer, un desafío complejo debido a la naturaleza adquirida y multigénica de la enfermedad, particularmente en tumores esporádicos. A diferencia de los tumores hereditarios, como el retinoblastoma o el tumor de Wilms, donde las mutaciones genéticas específicas son claras, la mayoría de los cánceres involucran una red compleja de alteraciones que interactúan con factores externos. Un obstáculo clave en este tipo de estudios es la dificultad para definir modelos "puros" de cáncer humano, ya que las comorbilidades comunes, como la hipertensión, la diabetes y las enfermedades inflamatorias crónicas, complican el panorama molecular. Estas patologías no solo afectan el microambiente tumoral, sino que también activan

rutas genéticas compartidas, como la proliferación celular y la angiogénesis, esenciales en la progresión del cáncer. Genes como HIF-1 y LOX-1, implicados en la regulación de procesos angiogénicos y de respuesta a la hipoxia en enfermedades cardiovasculares, también juegan un papel crucial en la progresión tumoral al inducir factores angiogénicos como VEGF. En el contexto de nuestra investigación, esta complejidad genómica y la influencia de las comorbilidades resaltan las limitaciones metodológicas inherentes a los estudios centrados únicamente en mutaciones. Aunque hemos analizado las alteraciones mutacionales en las cohortes de nuestro estudio, la presencia de enfermedades concurrentes en los pacientes puede estar influyendo en las vías moleculares activadas, limitando la capacidad para establecer correlaciones genotipo-fenotipo claras y puras.

Otro aspecto importante en el que hay que poner el foco es en las limitaciones asociadas al uso de la técnica VIGex para evaluar el contexto inmunológico del tumor. Esta herramienta no fue diseñada específicamente para estudiar la metástasis hepática o los patrones de diseminación, sino para analizar la respuesta inmune tumoral, lo que limita su aplicabilidad en este estudio. Además, existe un sesgo de selección, dado que se aplicó, de nuevo, principalmente en pacientes seleccionados para ensayos clínicos, lo que puede no reflejar la diversidad de la población general con enfermedad metastásica. Destacar que el análisis se realizó solo en el tumor primario, lo que no proporciona una visión adecuada de la afectación metastásica, donde el microambiente tumoral puede diferir significativamente. Existen, además, otras herramientas disponibles que podrían ofrecer una evaluación más integral tanto del tumor primario como de las metástasis. Por lo tanto, es crucial validar estos resultados mediante estudios adicionales que confirmen su relevancia clínica en un contexto metastásico más amplio y representativo.

Finalmente, hay que recordar que el CCR es una enfermedad altamente heterogénea, tanto espacial como temporalmente. Las pruebas moleculares realizadas en una única muestra pueden no reflejar la complejidad del tumor en su totalidad, ya que la zona analizada podría no ser representativa. Además, la evolución del tumor y la selección clonal bajo tratamientos modifican su perfil molecular a lo largo del tiempo. Esta heterogeneidad tumoral, influida por la

progresión y el tratamiento, no se contempla completamente en el análisis molecular realizado. En el futuro, una estrategia para mitigar este impacto podría ser la realización de análisis seriados mediante NGS en biopsias líquidas a lo largo de la evolución oncológica de los pacientes, lo cual permitiría una caracterización más exhaustiva y dinámica de la enfermedad, y al mismo tiempo es una prueba accesible y que no entraña peligro para el paciente.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. Uno de cada cinco pacientes con CCRm irresecable, sin mutaciones en *BRAF*^{V600E} y con MSS, presenta enfermedad permanentemente limitada al hígado. Estos pacientes presentan una mayor frecuencia de enfermedad sincrónica y una menor presencia de tumores de recto en comparación con aquellos con afectación exclusivamente extrahepática. Su identificación precoz podría facilitar la selección de candidatos para estrategias terapéuticas específicas.
2. Se identifica una menor frecuencia de mutaciones en *KRAS* en pacientes con enfermedad hepática exclusiva, mientras que las mutaciones en *APC* son más prevalentes en aquellos con afectación hepática y extrahepática. Además, los pacientes con afectación metastásica múltiple, hepática y extrahepática, presentan un mayor número de mutaciones y genes alterados por muestra en comparación con aquellos con diseminación limitada al hígado o exclusivamente extrahepática. No se observan otras diferencias significativas en el perfil mutacional según el patrón de distribución metastásica. Teniendo en cuenta la magnitud de las diferencias observadas, es poco probable que los hallazgos obtenidos tengan una relevancia clínica significativa.
3. El análisis de agrupación génica realizado revela un enriquecimiento de genes involucrados en al menos cinco *hallmarks* del cáncer en pacientes con afectación metastásica múltiple. Estos incluyen activación de la invasión y metástasis, resistencia a la muerte celular, evasión de supresores del crecimiento, mantenimiento de señales proliferativas y capacidad de inmortalidad replicativa. Estas diferencias podrían reflejar la necesidad de las células tumorales de adaptarse a múltiples microambientes, aunque esta hipótesis requiere ser validada.
4. El análisis del contexto inmunológico del tumor primario mediante la firma VIGex mostró que los tumores clasificados como *cold* se asocian predominantemente con enfermedad metastásica hepática, mientras que

aquellos sin afectación hepática presentan con mayor frecuencia un perfil *iCold* o *hot*. Estos hallazgos, que requieren confirmación, resaltan la importancia de evaluar el microambiente inmunológico del tumor primario y su influencia en el patrón de diseminación metastásica.

5. En pacientes con CCR metastásico sin afectación hepática, se observa una mayor supervivencia global, a pesar de presentar perfiles mutacionales homogéneos respecto a otros subgrupos. Estos hallazgos sugieren que el microambiente tumoral, junto con su interacción con el sistema inmunológico, desempeña un papel determinante en la evolución de la enfermedad, respaldando la necesidad de futuras investigaciones en esta línea.

9. LÍNEAS FUTURAS

9. LÍNEAS FUTURAS

La caracterización clínica, patológica y molecular de los pacientes con CCRm y enfermedad permanentemente limitada al hígado representa el primer paso en la comprensión de este subgrupo de pacientes. Sin embargo, el comportamiento metastásico del CCR no puede explicarse únicamente a partir de su perfil genómico. La naturaleza del proceso metastásico es altamente compleja y multifactorial, y su organotropismo parece depender de múltiples niveles de regulación biológica. En este sentido, el siguiente paso lógico es expandir el análisis molecular más allá de las mutaciones somáticas, incorporando el estudio del microambiente tumoral, la interacción con el sistema inmunológico y el papel modulador del hígado en este contexto.

Gracias al trabajo desarrollado en esta tesis, se ha establecido una colaboración con la *Liver Metastasis Research Network*, una iniciativa internacional centrada en el estudio de la biología de las metástasis hepáticas en distintos tipos tumorales. Uno de los ejes principales de esta colaboración es analizar la relación entre el patrón de crecimiento de las metástasis hepáticas (desmoplásico/encapsulado vs. de reemplazo) y el patrón de diseminación metastásica. Este estudio se focaliza especialmente en pacientes con enfermedad hepática localizada y resecable, donde es posible caracterizar el patrón de crecimiento directamente en la pieza quirúrgica. La correlación de estos hallazgos anatomopatológicos con técnicas de imagen avanzadas permitirá identificar precozmente estos patrones, con la perspectiva de aplicar estos conocimientos a pacientes con metástasis hepáticas irresecables. Para ello, se trabaja en estrecha colaboración con el equipo de anatomía patológica y la unidad de radiómica del VHIO, así como con el ICO Bellvitge y la Translational Cancer Research Unit de Amberes, liderada por Peter Vermulen, en el marco del estudio prospectivo POEM, cuyo objetivo es correlacionar patrones de crecimiento metastásico con hallazgos en resonancia magnética.

Otro resultado significativo derivado de esta tesis ha sido la creación del primer grupo de trabajo enfocado en metástasis hepáticas en el VHIO. Este equipo multidisciplinario, que integra diferentes grupos de investigación del instituto, permitirá abordar este fenómeno desde una perspectiva integral y traslacional.

Una de las principales líneas de investigación de este grupo es el papel inmunomodulador del hígado en el desarrollo metastásico. Para ello, se plantea un enfoque innovador que parte del estudio del hígado sano en pacientes con CCR localizado, con el objetivo de determinar si sus características pueden influir en el patrón de recaída y en la distribución metastásica. En esta línea, se propone un abordaje panómico, que combine datos genómicos, transcriptómicos, epigenómicos e inmunológicos para una mejor caracterización de este proceso.

En paralelo, nuestro grupo ha obtenido recientemente una beca competitiva del FIS, cuyo objetivo es esclarecer los mecanismos moleculares que regulan la interacción entre el tumor y su microambiente, con especial énfasis en los procesos de inmunotolerancia descritos en este trabajo. Además, se ha presentado una nueva propuesta para el estudio de reguladores transcriptómicos de las metástasis hepáticas mediante secuenciación de ARN a nivel de célula única (*single-cell RNA-seq*), lo que permitirá caracterizar en mayor profundidad las dinámicas celulares y del microambiente tumoral que influyen en este proceso.

El conocimiento generado en esta tesis ha sido la piedra angular sobre la que se están construyendo todas estas líneas de investigación, consolidando una base científica que abre múltiples vías de exploración en los próximos años. La integración de enfoques clínicos, genómicos, inmunológicos y funcionales será clave para mejorar nuestra comprensión de la diseminación metastásica en el CCR y, en última instancia, para desarrollar estrategias terapéuticas más precisas y personalizadas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May 4;74(3):229–63.
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683–91.
3. Siegel RL, Torre LA, Soerjomataram I, Hayes RB, Bray F, Weber TK, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut*. 2019 Dec;68(12):2179–85.
4. Bailey CE, Hu CY, You YN, Bednarski BK, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, et al. Increasing Disparities in the Age-Related Incidences of Colon and Rectal Cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg*. 2015 Jan 1;150(1):17.
5. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2024. Disponible en: <https://redecana.org/es/noticias/37/redecana-publica-las-estimaciones-de-la-incidencia-del-cancer-en-espana-2024>.
6. AJCC. TNM of colorectal carcinoma 2017. Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Pages/8EUpdates.aspx#>.
7. Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, Rutherford R, Staley CA, Cardona K, et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clin Colorectal Cancer*. 2016 Mar;15(1):67–73.
8. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Impact of screening colonoscopy on outcomes in colon cancer surgery. *JAMA Surg*. 2013;148(8):747–54.
9. Cardoso R, Guo F, Heisser T, De Schutter H, Van Damme N, Nilbert MC, et al. Overall and stage-specific survival of patients with screen-detected colorectal cancer in European countries: A population-based study in 9 countries. *Lancet Reg Heal - Eur*. 2022 Oct;21:100458.
10. Programa de cribado de cáncer colorrectal [Internet]. Ministerio de Sanidad. 2023. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/cribado/cancer/colorrectal.htm>.
11. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(3):145–64.
12. van Gestel YRBM, de Hingh IHJT, van Herk-Sukel MPP, van Erning FN, Beerepoot L V., Wijsman JH, et al. Patterns of metachronous metastases after curative treatment of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol*. 2014;38(4):448–54.
13. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buyse M, Andre T, et al. Evidence for Cure by Adjuvant Therapy in Colon Cancer: Observations Based on Individual Patient Data From 20,898 Patients on 18 Randomized Trials. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 20;27(6):872–7.
14. Figueredo A, Rumble RB, Maroun J, Earle CC, Cummings B, McLeod R, et al. Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline. *BMC Cancer*. 2003 Dec 6;3(1):26.
15. Sargent DJ, Wieand HS, Haller DG, Gray R, Benedetti JK, Buyse M, et al. Disease-Free Survival Versus Overall Survival As a Primary End Point for Adjuvant Colon Cancer Studies: Individual Patient Data From 20,898 Patients on 18 Randomized Trials. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 1;23(34):8664–70.
16. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary Colorectal Cancer. Guttmacher AE, Collins FS, editors. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6;348(10):919–32.
17. Lowery JT, Ahnen DJ, Schroy PC, Hampel H, Baxter N, Boland CR, et al. Understanding the

- contribution of family history to colorectal cancer risk and its clinical implications: A state-of-the-science review. *Cancer*. 2016 Sep 3;122(17):2633–45.
18. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):713–32.
 19. Akimoto N, Ugai T, Zhong R, Hamada T, Fujiyoshi K, Giannakis M, et al. Rising incidence of early-onset colorectal cancer — a call to action. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Apr 20;18(4):230–43.
 20. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. 2021 Oct 28;21(10):653–67.
 21. Basu AK. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 23;19(4).
 22. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun;61(5):759–67.
 23. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med*. 1988 Sep;319(9):525–32.
 24. Grady WM, Carethers JM. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1079–99.
 25. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010 May;138(6):2073-2087.e3.
 26. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JPJ. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 1999 Jul 20;96(15):8681–6.
 27. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Suemoto Y, Meyerhardt JA, Fuchs CS. Molecular correlates with MGMT promoter methylation and silencing support CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer. *Gut*. 2007 Jun 29;56(11):1564–71.
 28. Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CPE, Shen H, Byun HM, Van Den Berg D, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res*. 2012 Feb;22(2):271–82.
 29. Nguyen B, Fong C, Luthra A, Smith SA, DiNatale RG, Nandakumar S, et al. Genomic characterization of metastatic patterns from prospective clinical sequencing of 25,000 patients. *Cell*. 2022 Feb;185(3):563-575.e11.
 30. Podsypanina K, Du YCN, Jechlinger M, Beverly LJ, Hambarzumyan D, Varmus H. Seeding and Propagation of Untransformed Mouse Mammary Cells in the Lung. *Science* (80-). 2008 Sep 26;321(5897):1841–4.
 31. Chan DKH, Buczacki SJA. Tumour heterogeneity and evolutionary dynamics in colorectal cancer. *Oncogenesis*. 2021;10(7).
 32. Dang HX, Krasnick BA, White BS, Grossman JG, Strand MS, Zhang J, et al. The clonal evolution of metastatic colorectal cancer. *Sci Adv*. 2020;6(24).
 33. Paschos KA, Majeed AW, Bird NC. Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer - Pathobiological pathways with clinical significance. *World J Gastroenterol*. 2014;20(14):3719–37.
 34. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017 Feb;168(4):670–91.
 35. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun 1;119(6):1420–8.
 36. Cañellas-Socias A, Cortina C, Hernando-Momblona X, Palomo-Ponce S, Mulholland EJ, Turon G, et al. Metastatic recurrence in colorectal cancer arises from residual EMP1+ cells. *Nature*. 2022;611(7936):603–13.
 37. Kang Y, Pantel K. Tumor Cell Dissemination: Emerging Biological Insights from Animal Models and Cancer Patients. *Cancer Cell*. 2013 May;23(5):573–81.

38. Pretzsch E, Bösch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, et al. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol*. 2019;2019.
39. Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: Focus on colon cancer. *Cancer Microenviron*. 2008;1(1):69–83.
40. Placke T, Kopp HG, Salih HR. The wolf in sheep's clothing: Platelet-derived "pseudo self" impairs cancer cell "missing self" recognition by NK cells. *Oncoimmunology*. 2012;1(4):557–9.
41. Vekemans K, Braet F. Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J Gastroenterol*. 2005;11(33):5095–102.
42. Van Den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Høyer-Hansen G, et al. The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: Biology and clinical implications. *Cancer Res*. 2013;73(7):2031–43.
43. Brodt P. Role of the microenvironment in liver metastasis: From pre- to prometastatic niches. *Clin Cancer Res*. 2016;22(24):5971–82.
44. Massagué J, Ganesh K. Metastasis-Initiating Cells and Ecosystems. *Cancer Discov*. 2021 Apr 2;11(4):971–94.
45. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):563–72.
46. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998;153(3):865–73.
47. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):834–46.
48. Van Dam PJ, Van Der Stok EP, Teuwen LA, Van Den Eynden GG, Illemann M, Frentzas S, et al. International consensus guidelines for scoring the histopathological growth patterns of liver metastasis. *Br J Cancer*. 2017;117(10):1427–41.
49. Latacz E, Höppener D, Bohlok A, Leduc S, Tabariès S, Fernández Moro C, et al. Histopathological growth patterns of liver metastasis: updated consensus guidelines for pattern scoring, perspectives and recent mechanistic insights. *Br J Cancer*. 2022 Oct 5;127(6):988–1013.
50. Frentzas S, Simoneau E, Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Kostaras E, et al. Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. *Nat Med*. 2016;22(11):1294–302.
51. Fernández Moro C, Bozóky B, Geyer N, Engstrand J, Dirix L, Vermeulen P, et al. What's in a name? Refining the nomenclature of liver metastases growth patterns by changing "desmoplastic" to "encapsulated." *BJC Reports*. 2023 Dec 12;1(1):19.
52. Fernández Moro C, Bozóky B, Gerling M. Growth patterns of colorectal cancer liver metastases and their impact on prognosis: A systematic review. *BMJ Open Gastroenterol*. 2018;5(1):1–12.
53. Fleischer JR, Schmitt AM, Haas G, Xu X, Zeisberg EM, Bohnenberger H, et al. Molecular differences of angiogenic versus vessel co-opting colorectal cancer liver metastases at single-cell resolution. *Mol Cancer*. 2023 Jan 24;22(1):17.
54. Gao Y, Bado I, Wang H, Zhang W, Rosen JM, Zhang XHF. Metastasis Organotropism: Redefining the Congenial Soil. *Dev Cell*. 2019;49(3):375–91.
55. Obenauf AC, Massagué J. Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis. *Trends in Cancer*. 2015;1(1):76–91.
56. Birkbak NJ, McGranahan N. Cancer Genome Evolutionary Trajectories in Metastasis. *Cancer Cell*.

- 2020 Jan;37(1):8–19.
57. Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):158–73.
 58. Budczies J, von Winterfeld M, Klauschen F, Bockmayr M, Lennerz JK, Denkert C, et al. The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers. *Oncotarget*. 2015 Jan 1;6(1):570–83.
 59. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989 Aug;8(2):98–101.
 60. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):453–8.
 61. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3271–7.
 62. Soni A, Ren Z, Hameed O, Chanda D, Morgan CJ, Siegal GP, et al. Breast Cancer Subtypes Predispose the Site of Distant Metastases. *Am J Clin Pathol*. 2015 Apr 1;143(4):471–8.
 63. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, et al. Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3108–14.
 64. Hugén N, Van de Velde CJH, De Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol*. 2014;25(3):651–7.
 65. Bos PD, Zhang XHF, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 2009 Jun 6;459(7249):1005–9.
 66. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003 Jun;3(6):537–49.
 67. Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*. 2007 May;8(5):341–52.
 68. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab*. 2008 Jan;7(1):11–20.
 69. Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddlestun SE, Zhao Z, et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*. 2015 Nov 14;527(7577):186–91.
 70. Loo JM, Scherl A, Nguyen A, Man FY, Weinberg E, Zeng Z, et al. Extracellular Metabolic Energetics Can Promote Cancer Progression. *Cell*. 2015 Jan;160(3):393–406.
 71. He K, Wang Z, Luo M, Li B, Ding N, Li L, et al. Metastasis organotropism in colorectal cancer: advancing toward innovative therapies. *J Transl Med*. 2023 Sep 9;21(1):612.
 72. Hu Z, Li Z, Ma Z, Curtis C. Multi-cancer analysis of clonality and the timing of systemic spread in paired primary tumors and metastases. *Nat Genet*. 2020 Jul 18;52(7):701–8.
 73. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms The Invasion-Metastasis Cascade. *Cell*. 2011;147(2):275–92.
 74. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med*. 2001 Jan 1;7(1):94–100.
 75. Saberzadeh-Ardestani B, Jones JC, Hubbard JM, McWilliams RR, Halfdanarson TR, Shi Q, et al. Association Between Survival and Metastatic Site in Mismatch Repair–Deficient Metastatic Colorectal Cancer Treated With First-line Pembrolizumab. *JAMA Netw Open*. 2023 Feb 22;6(2):e230400.
 76. Bullock AJ, Schlechter BL, Fakih MG, Tsimberidou AM, Grossman JE, Gordon MS, et al. Botensilimab plus balstilimab in relapsed/refractory microsatellite stable metastatic colorectal cancer: a phase 1 trial. *Nat Med*. 2024 Jun 13;

77. Yu J, Green MD, Li S, Sun Y, Journey SN, Choi JE, et al. Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination. *Nat Med*. 2021 Jan 4;27(1):152–64.
78. Martini G, Dienstmann R, Ros J, Baraibar I, Cuadra-Urteaga JL, Salva F, et al. Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2020 Jan 24;12:175883592093608.
79. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1757–65.
80. Bussini L, Rosselli Del Turco E, Pasquini Z, Scolz K, Amedeo A, Beci G, et al. Risk factors for persistent enterococcal bacteraemia: a multicentre retrospective study. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Jun;29:386–9.
81. Martinelli E, Ciardiello D, Martini G, Troiani T, Cardone C, Vitiello PP, et al. Implementing anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy in metastatic colorectal cancer: challenges and future perspectives. *Ann Oncol*. 2020 Jan;31(1):30–40.
82. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2015 Jan 1;136(1):83–90.
83. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, et al. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *J Clin Oncol*. 2019 Feb 1;37(4):286–95.
84. Baraibar I, Ros J, Mulet N, Salvà F, Argilés G, Martini G, et al. Incorporating traditional and emerging biomarkers in the clinical management of metastatic colorectal cancer: an update. *Expert Rev Mol Diagn*. 2020 Jul 2;20(7):653–64.
85. Knijn N, Mekenkamp LJM, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2011 Mar 1;104(6):1020–6.
86. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386–422.
87. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350–6.
88. Pitroda SP, Khodarev NN, Huang L, Uppal A, Wightman SC, Ganai S, et al. Integrated molecular subtyping defines a curable oligometastatic state in colorectal liver metastasis. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–8.
89. Spurr LF, Martinez CA, Katipally RR, Iyer SC, Pugh SA, Bridgewater JA, et al. A proliferative subtype of colorectal liver metastases exhibits hypersensitivity to cytotoxic chemotherapy. *npj Precis Oncol*. 2022 Oct 14;6(1):72.
90. Moosavi SH, Eide PW, Eilertsen IA, Brunsell TH, Berg KCG, Røsok BI, et al. De novo transcriptomic subtyping of colorectal cancer liver metastases in the context of tumor heterogeneity. *Genome Med*. 2021;13(1):1–19.
91. Pitroda SP, Khodarev NN, Huang L, Uppal A, Wightman SC, Ganai S, et al. Integrated molecular subtyping defines a curable oligometastatic state in colorectal liver metastasis. *Nat Commun*. 2018 May 4;9(1):1793.
92. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019;394(10207):1467–80.

93. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and Management of Liver Metastases From Colorectal Cancer. *Ann Surg.* 2006 Aug;244(2):254–9.
94. Ratti F, Cipriani F, Fiorentini G, Burgio V, Ronzoni M, Della Corte A, et al. Evolution of Surgical Treatment of Colorectal Liver Metastases in the Real World: Single Center Experience in 1212 Cases. *Cancers (Basel).* 2021 Mar 9;13(5):1178.
95. Adam R, Kitano Y. Multidisciplinary approach of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2019;3(1):50–6.
96. Hagness M, Foss A, Line PD, Scholz T, Jørgensen PF, Fosby B, et al. Liver transplantation for nonresectable liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg.* 2013;257(5):800–6.
97. Dueland S, Syversveen T, Solheim JM, Solberg S, Grut H, Bjørnbeth BA, et al. Survival following liver transplantation for patients with nonresectable liver-only colorectal metastases. *Ann Surg.* 2020;271(2):212–8.
98. Ros J, Salva F, Dopazo C, López D, Saoudi N, Baraibar I, et al. Liver transplantation in metastatic colorectal cancer: are we ready for it? *Br J Cancer.* 2023 May 11;128(10):1797–806.
99. Cervantes A, Adam R, Roselló S, Arnold D, Normanno N, Taïeb J, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2023 Jan;34(1):10–32.
100. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Kiani A, et al. Relevance of liver-limited disease in metastatic colorectal cancer: Subgroup findings of the FIRE-3/AIO KRK0306 trial. *Int J Cancer.* 2018;142(5):1047–55.
101. Wang J, Li S, Liu Y, Zhang C, Li H, Lai B. Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis. *Cancer Med.* 2020 Jan 6;9(1):361–73.
102. Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases – a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer.* 2018 Dec 15;18(1):78.
103. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer. *Ann Surg.* 1999;230(3):309.
104. Sasaki K, Morioka D, Conci S, Margonis GA, Sawada Y, Ruzzenente A, et al. The Tumor Burden Score: A New “Metro-ticket” Prognostic Tool For Colorectal Liver Metastases Based on Tumor Size and Number of Tumors. *Ann Surg.* 2018 Jan;267(1):132–41.
105. Margonis GA, Sasaki K, Gholami S, Kim Y, Andreatos N, Rezaee N, et al. Genetic And Morphological Evaluation (GAME) score for patients with colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2018 Jul 11;105(9):1210–20.
106. Vera R, González-Flores E, Rubio C, Urbano J, Valero Camps M, Ciampi-Dopazo JJ, et al. Multidisciplinary management of liver metastases in patients with colorectal cancer: a consensus of SEOM, AEC, SEOR, SERVEI, and SEMNIM. *Clin Transl Oncol.* 2020 May 29;22(5):647–62.
107. Villard C, Abdelrafee A, Habib M, Ndegwa N, Jorns C, Sparrelid E, et al. Prediction of survival in patients with colorectal liver metastases- development and validation of a prognostic score model. *Eur J Surg Oncol.* 2022 Dec;48(12):2432–9.
108. Höppener DJ, Galjart B, Nierop PMH, Buisman FE, van der Stok EP, Coebergh van den Braak RRJ, et al. Histopathological Growth Patterns and Survival After Resection of Colorectal Liver Metastasis: An External Validation Study. *JNCI Cancer Spectr.* 2021 May 6;5(3).
109. Denbo JW, Yamashita S, Passot G, Egger M, Chun YS, Kopetz SE, et al. RAS Mutation Is Associated with Decreased Survival in Patients Undergoing Repeat Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases. *J Gastrointest Surg.* 2017 Jan 22;21(1):68–77.

110. Amikura K, Akagi K, Ogura T, Takahashi A, Sakamoto H. The RAS mutation status predicts survival in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastases: The results from a genetic analysis of all- RAS. *J Surg Oncol*. 2018 Mar;117(4):745–55.
111. Tsilimigras DI, Ntanasis-Stathopoulos I, Bagante F, Moris D, Cloyd J, Spartalis E, et al. Clinical significance and prognostic relevance of KRAS, BRAF, PI3K and TP53 genetic mutation analysis for resectable and unresectable colorectal liver metastases: A systematic review of the current evidence. *Surg Oncol*. 2018 Jun;27(2):280–8.
112. Schirripa M, Bergamo F, Cremolini C, Casagrande M, Lonardi S, Aprile G, et al. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. *Br J Cancer*. 2015 Jun 5;112(12):1921–8.
113. Kemeny NE, Chou JF, Capanu M, Gewirtz AN, Cercek A, Kingham TP, et al. KRAS mutation influences recurrence patterns in patients undergoing hepatic resection of colorectal metastases. *Cancer*. 2014 Dec 15;120(24):3965–71.
114. Teng HW, Huang YC, Lin JK, Chen WS, Lin TC, Jiang JK, et al. BRAF mutation is a prognostic biomarker for colorectal liver metastasectomy. *J Surg Oncol*. 2012 Aug 1;106(2):123–9.
115. Martín-Cullell B, Virgili AC, Riera P, Fumagalli C, Mirallas O, Pelegrín FJ, et al. Histopathological, Clinical, And Molecular (HICAM) score for patients with colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2024 Mar 2;111(3).
116. Marmorino F, Prisciandaro M, Giordano M, Ortolan E, Crucitta S, Manca P, et al. Circulating Tumor DNA as a Marker of Minimal Residual Disease After Radical Resection of Colorectal Liver Metastases. *JCO Precis Oncol*. 2022 Nov;(6).
117. Nishioka Y, Chun YS, Overman MJ, Cao HST, Tzeng CWD, Mason MC, et al. Effect of Co-mutation of RAS and TP53 on Postoperative ctDNA Detection and Early Recurrence after Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases. *J Am Coll Surg*. 2022 Apr 15;234(4):474–83.
118. Newhook TE, Overman MJ, Chun YS, Dasari A, Tzeng CWD, Cao HST, et al. Prospective Study of Perioperative Circulating Tumor DNA Dynamics in Patients Undergoing Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg*. 2023 May;277(5):813–20.
119. Øgaard N, Reinert T, Henriksen T V., Frydendahl A, Aagaard E, Ørntoft MBW, et al. Tumour-agnostic circulating tumour DNA analysis for improved recurrence surveillance after resection of colorectal liver metastases: A prospective cohort study. *Eur J Cancer*. 2022 Mar;163:163–76.
120. Bolhuis K, van 't Erve I, Mijns C, Delis – Van Diemen PM, Huiskens J, Komurcu A, et al. Postoperative circulating tumour DNA is associated with pathologic response and recurrence-free survival after resection of colorectal cancer liver metastases. *EBioMedicine*. 2021 Aug;70:103498.
121. Tie J, Wang Y, Cohen J, Li L, Hong W, Christie M, et al. Circulating tumor DNA dynamics and recurrence risk in patients undergoing curative intent resection of colorectal cancer liver metastases: A prospective cohort study. *PLOS Med*. 2021 May 3;18(5):e1003620.
122. Wang DS, Yang H, Liu XY, Chen ZG, Wang Y, Fong WP, et al. Dynamic monitoring of circulating tumor DNA to predict prognosis and efficacy of adjuvant chemotherapy after resection of colorectal liver metastases. *Theranostics*. 2021;11(14):7018–28.
123. He Y, Ma X, Chen K, Liu F, Cai S, Han-Zhang H, et al. Perioperative Circulating Tumor DNA in Colorectal Liver Metastases: Concordance with Metastatic Tissue and Predictive Value for Tumor Burden and Prognosis. *Cancer Manag Res*. 2020 Mar;Volume 12:1621–30.
124. Narayan RR, Goldman DA, Gonen M, Reichel J, Huberman KH, Raj S, et al. Peripheral Circulating Tumor DNA Detection Predicts Poor Outcomes After Liver Resection for Metastatic Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2019 Jun;26(6):1824–32.

125. Kobayashi S, Nakamura Y, Taniguchi H, Odegaard JI, Nomura S, Kojima M, et al. Impact of Preoperative Circulating Tumor DNA Status on Survival Outcomes After Hepatectomy for Resectable Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol*. 2021 Aug 3;28(8):4744–55.
126. Prades J, Borrás JM. Shifting sands: adapting the multidisciplinary team model to technological and organizational innovations in cancer care. *Futur Oncol*. 2014 Oct;10(13):1995–8.
127. Woodington GF, Waugh JM. Results of resection of metastatic tumors of the liver. *Am J Surg*. 1963 Jan;105(1):24–9.
128. Adam R, De Gramont A, Figueras J, Guthrie A, Kokudo N, Kunstlinger F, et al. The Oncosurgery Approach to Managing Liver Metastases from Colorectal Cancer: A Multidisciplinary International Consensus. *Oncologist*. 2012 Oct 1;17(10):1225–39.
129. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunvén P, et al. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery*. 1990 May;107(5):521–7.
130. Wicherts DA, de Haas RJ, Andreani P, Sotirov D, Salloum C, Castaing D, et al. Impact of portal vein embolization on long-term survival of patients with primarily unresectable colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2010 Jan 19;97(2):240–50.
131. Imai K, Allard MA, Castro Benitez C, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, et al. Long-term outcomes of radiofrequency ablation combined with hepatectomy compared with hepatectomy alone for colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2017 Mar 14;104(5):570–9.
132. Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two-Stage Hepatectomy: A Planned Strategy to Treat Irresectable Liver Tumors. *Ann Surg*. 2000 Dec;232(6):777–85.
133. Wicherts DA, Miller R, de Haas RJ, Bitsakou G, Vibert E, Veilhan LA, et al. Long-Term Results of Two-Stage Hepatectomy for Irresectable Colorectal Cancer Liver Metastases. *Ann Surg*. 2008 Dec;248(6):994–1005.
134. Imai K, Benitez CC, Allard MA, Vibert E, Cunha AS, Cherqui D, et al. Failure to Achieve a 2-Stage Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg*. 2015 Nov;262(5):772–9.
135. de Santibañes E, Clavien PA. Playing Play-Doh to Prevent Postoperative Liver Failure. *Ann Surg*. 2012 Mar;255(3):415–7.
136. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, et al. Right Portal Vein Ligation Combined With In Situ Splitting Induces Rapid Left Lateral Liver Lobe Hypertrophy Enabling 2-Stage Extended Right Hepatic Resection in Small-for-Size Settings. *Ann Surg*. 2012 Mar;255(3):405–14.
137. Torzilli G, Adam R, Viganò L, Imai K, Goransky J, Fontana A, et al. Surgery of Colorectal Liver Metastases: Pushing the Limits. *Liver Cancer*. 2017;6(1):80–9.
138. Adam R, Yi B, Innominato PF, Barroso E, Laurent C, Giulianti F, et al. Resection of colorectal liver metastases after second-line chemotherapy: is it worthwhile? A LiverMetSurvey analysis of 6415 patients. *Eur J Cancer*. 2017 Jun;78:7–15.
139. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, DeMatteo RP, Ben-Porat L, Little S, et al. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg*. 2002 Oct;236(4):397–406; discussion 406–7.
140. de Jong MC, Pulitano C, Ribero D, Strub J, Mentha G, Schulick RD, et al. Rates and patterns of recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis: an international multi-institutional analysis of 1669 patients. *Ann Surg*. 2009 Sep;250(3):440–8.
141. Adam R, Bismuth H, Castaing D, Waechter F, Navarro F, Abascal A, et al. Repeat hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg*. 1997 Jan;225(1):51–60; discussion 60–2.

142. Yamamoto J, Kosuge T, Shimada K, Yamasaki S, Moriya Y, Sugihara K. Repeat liver resection for recurrent colorectal liver metastases. *Am J Surg.* 1999 Oct;178(4):275–81.
143. Petrowsky H, Gonen M, Jarnagin W, Lorenz M, DeMatteo R, Heinrich S, et al. Second liver resections are safe and effective treatment for recurrent hepatic metastases from colorectal cancer: a bi-institutional analysis. *Ann Surg.* 2002 Jun;235(6):863–71.
144. Nagakura S, Shirai Y, Suda T, Hatakeyama K. Multiple repeat resections of intra- and extrahepatic recurrences in patients undergoing initial hepatectomy for colorectal carcinoma metastases. *World J Surg.* 2002 Feb;26(2):141–7.
145. Yan TD, Sim J, Black D, Niu R, Morris DL. Systematic review on safety and efficacy of repeat hepatectomy for recurrent liver metastases from colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2007 Jul;14(7):2069–77.
146. Shady W, Petre EN, Do KG, Gonen M, Yarmohammadi H, Brown KT, et al. Percutaneous Microwave versus Radiofrequency Ablation of Colorectal Liver Metastases: Ablation with Clear Margins (A0) Provides the Best Local Tumor Control. *J Vasc Interv Radiol.* 2018 Feb;29(2):268-275.e1.
147. Kobiela J, Spychalski P, Marvaso G, Ciardo D, Dell'Acqua V, Kraja F, et al. Ablative stereotactic radiotherapy for oligometastatic colorectal cancer: Systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018 Sep;129:91–101.
148. Tree AC, Khoo VS, Eeles RA, Ahmed M, Dearnaley DP, Hawkins MA, et al. Stereotactic body radiotherapy for oligometastases. *Lancet Oncol.* 2013 Jan;14(1):e28–37.
149. Uhlig J, Lukovic J, Dawson LA, Patel RA, Cavnar MJ, Kim HS. Locoregional Therapies for Colorectal Cancer Liver Metastases: Options Beyond Resection. *Am Soc Clin Oncol Educ B.* 2021 Jun;(41):133–46.
150. Gillams A, Goldberg N, Ahmed M, Bale R, Breen D, Callstrom M, et al. Thermal ablation of colorectal liver metastases: a position paper by an international panel of ablation experts, the interventional oncology sans frontières meeting 2013. *Eur Radiol.* 2015 Dec 22;25(12):3438–54.
151. Wang X, Sofocleous CT, Erinjeri JP, Petre EN, Gonen M, Do KG, et al. Margin Size is an Independent Predictor of Local Tumor Progression After Ablation of Colon Cancer Liver Metastases. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2013 Feb 26;36(1):166–75.
152. Ruers T, Van Coevorden F, Punt CJA, Pierie JPEN, Borel-Rinkes I, Ledermann JA, et al. Local Treatment of Unresectable Colorectal Liver Metastases: Results of a Randomized Phase II Trial. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2017 Sep;109(9).
153. Meijerink MR, van der Lei S, Dijkstra M, Versteeg KS, Buffart TE, Lissenberg-Witte BI, et al. Surgery versus thermal ablation for small-size colorectal liver metastases (COLLISION): An international, multicenter, phase III randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 2024 Jun 10;42(17_suppl):LBA3501–LBA3501.
154. Pathak S, Jones R, Tang JMF, Parmar C, Fenwick S, Malik H, et al. Ablative therapies for colorectal liver metastases: a systematic review. *Color Dis.* 2011 Sep;13(9):e252–65.
155. Timmerman RD, Herman J, Cho LC. Emergence of Stereotactic Body Radiation Therapy and Its Impact on Current and Future Clinical Practice. *J Clin Oncol.* 2014 Sep 10;32(26):2847–54.
156. Palma DA, Olson R, Harrow S, Gaede S, Louie A V., Haasbeek C, et al. Stereotactic Ablative Radiotherapy for the Comprehensive Treatment of Oligometastatic Cancers: Long-Term Results of the SABR-COMET Phase II Randomized Trial. *J Clin Oncol.* 2020 Sep 1;38(25):2830–8.
157. Chalkidou A, Macmillan T, Grzeda MT, Peacock J, Summers J, Eddy S, et al. Stereotactic ablative body radiotherapy in patients with oligometastatic cancers: a prospective, registry-based, single-arm, observational, evaluation study. *Lancet Oncol.* 2021 Jan;22(1):98–106.

158. Scorsetti M, Comito T, Clerici E, Franzese C, Tozzi A, Iftode C, et al. Phase II trial on SBRT for unresectable liver metastases: long-term outcome and prognostic factors of survival after 5 years of follow-up. *Radiat Oncol*. 2018 Dec 26;13(1):234.
159. Herfarth KK, Debus J, Wannenmacher M. Stereotactic Radiation Therapy of Liver Metastases: Update of the Initial Phase-I/II Trial. In: *Controversies in Gastrointestinal Tumor Therapy*. Basel: KARGER; 2004. p. 100–5.
160. Chang DT, Swaminath A, Kozak M, Weintraub J, Koong AC, Kim J, et al. Stereotactic body radiotherapy for colorectal liver metastases. *Cancer*. 2011 Sep 1;117(17):4060–9.
161. Petrelli F, Comito T, Barni S, Pancera G, Scorsetti M, Ghidini A. Stereotactic body radiotherapy for colorectal cancer liver metastases: A systematic review. *Radiother Oncol*. 2018 Dec;129(3):427–34.
162. Justinger C, Gruden J, Kouladouros K, Stravodimos C, Reimer P, Tannapfel A, et al. Histopathological changes resulting from selective internal radiotherapy (SIRT). *J Surg Oncol*. 2018 Apr;117(5):1084–91.
163. Wang D, Louie J, Sze D. Intra-Arterial Therapies for Metastatic Colorectal Cancer. *Semin Intervent Radiol*. 2013 Feb 27;30(01):012–20.
164. Wasan HS, Gibbs P, Sharma NK, Taieb J, Heinemann V, Ricke J, et al. First-line selective internal radiotherapy plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with liver metastases from colorectal cancer (FOXFIRE, SIRFLOX, and FOXFIRE-Global): a combined analysis of three multicentre, randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol*. 2017 Sep;18(9):1159–71.
165. Garlipp B, Gibbs P, Van Hazel GA, Jeyarajah R, Martin RCG, Bruns CJ, et al. Secondary technical resectability of colorectal cancer liver metastases after chemotherapy with or without selective internal radiotherapy in the randomized SIRFLOX trial. *Br J Surg*. 2019 Nov 20;106(13):1837–46.
166. Mulcahy MF, Mahvash A, Pracht M, Montazeri AH, Bandula S, Martin RCG, et al. Radioembolization With Chemotherapy for Colorectal Liver Metastases: A Randomized, Open-Label, International, Multicenter, Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2021 Dec 10;39(35):3897–907.
167. Kemeny NE, Melendez FDH, Capanu M, Paty PB, Fong Y, Schwartz LH, et al. Conversion to Resectability Using Hepatic Artery Infusion Plus Systemic Chemotherapy for the Treatment of Unresectable Liver Metastases From Colorectal Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 20;27(21):3465–71.
168. Pak LM, Kemeny NE, Capanu M, Chou JF, Boucher T, Cercek A, et al. Prospective phase II trial of combination hepatic artery infusion and systemic chemotherapy for unresectable colorectal liver metastases: Long term results and curative potential. *J Surg Oncol*. 2018 Mar;117(4):634–43.
169. Groot Koerkamp B, Sadot E, Kemeny NE, Gönen M, Leal JN, Allen PJ, et al. Perioperative Hepatic Arterial Infusion Pump Chemotherapy Is Associated With Longer Survival After Resection of Colorectal Liver Metastases: A Propensity Score Analysis. *J Clin Oncol*. 2017 Jun 10;35(17):1938–44.
170. Creasy JM, Sadot E, Koerkamp BG, Chou JF, Gonen M, Kemeny NE, et al. Actual 10-year survival after hepatic resection of colorectal liver metastases: what factors preclude cure? *Surgery*. 2018 Jun;163(6):1238–44.
171. Goéré D, Pignon JP, Gelli M, Elias D, Benhaim L, Deschamps F, et al. Postoperative hepatic arterial chemotherapy in high-risk patients as adjuvant treatment after resection of colorectal liver metastases - a randomized phase II/III trial – PACHA-01 (NCT02494973). *BMC Cancer*. 2018 Dec 6;18(1):787.
172. Li Y hong, Wang DS, Gu YK, Wen L, Ren C, Wu XJ, et al. Adjuvant systemic chemotherapy with or without hepatic arterial infusion of floxuridine in patients following colorectal cancer liver metastases

- resection (HARVEST): A prospective, randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2023 Jun 1;41(16_suppl):3516–3516.
173. Akinwande O, Dendy M, Ludwig JM, Kim HS. Hepatic intra-arterial injection of irinotecan drug eluting beads (DEBIRI) for patients with unresectable colorectal liver metastases: A systematic review. *Surg Oncol*. 2017 Sep;26(3):268–75.
 174. Jones RP, Malik HZ, Fenwick SW, Terlizzo M, O'Grady E, Stremitzer S, et al. PARAGON II – A single arm multicentre phase II study of neoadjuvant therapy using irinotecan bead in patients with resectable liver metastases from colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2016 Dec;42(12):1866–72.
 175. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013 Nov;14(12):1208–15.
 176. Bridgewater JA, Pugh SA, Maishman T, Eminton Z, Mellor J, Whitehead A, et al. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis (New EPOC): long-term results of a multicentre, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Mar;21(3):398–411.
 177. Primrose J, Falk S, Finch-Jones M, Valle J, O'Reilly D, Siriwardena A, et al. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis: the New EPOC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2014 May;15(6):601–11.
 178. Gholami S, Grothey A. EGFR antibodies in resectable metastatic colorectal liver metastasis: more harm than benefit? *Lancet Oncol*. 2020 Mar;21(3):324–6.
 179. Sargent DJ. Effect of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin With or Without Cetuximab on Survival Among Patients With Resected Stage III Colon Cancer. *JAMA*. 2012 Apr 4;307(13):1383.
 180. Taieb J, Tabernero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem JL, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jul;15(8):862–73.
 181. Adam R, Delvart V, Pascal G, Vaeleanu A, Castaing D, Azoulay D, et al. Rescue Surgery for Unresectable Colorectal Liver Metastases Downstaged by Chemotherapy. *Ann Surg*. 2004 Oct;240(4):644–58.
 182. Vauthey JN, Pawlik TM, Ribero D, Wu TT, Zorzi D, Hoff PM, et al. Chemotherapy Regimen Predicts Steatohepatitis and an Increase in 90-Day Mortality After Surgery for Hepatic Colorectal Metastases. *J Clin Oncol*. 2006 May 1;24(13):2065–72.
 183. Delaunoy T, Alberts SR, Sargent DJ, Green E, Goldberg RM, Krook J, et al. Chemotherapy permits resection of metastatic colorectal cancer: experience from Intergroup N9741. *Ann Oncol*. 2005 Mar;16(3):425–9.
 184. Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, Goldberg RM, Mahoney MR, Dakhil SR, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin for Patients With Unresectable Liver-Only Metastases From Colorectal Cancer: A North Central Cancer Treatment Group Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 20;23(36):9243–9.
 185. Skof E, Rebersek M, Hlebanja Z, Ocvirk J. Capecitabine plus Irinotecan (XELIRI regimen) compared to 5-FU/LV plus Irinotecan (FOLFIRI regimen) as neoadjuvant treatment for patients with unresectable liver-only metastases of metastatic colorectal cancer: a randomised prospective phase II trial. *BMC Cancer*. 2009 Dec 22;9(1):120.
 186. Pozzo C, Basso M, Cassano A, Quirino M, Schinzari G, Trigila N, et al. Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer

- patients. *Ann Oncol*. 2004 Jun;15(6):933–9.
187. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nor. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1670–6.
 188. Ychou M, Viret F, Kramar A, Desseigne F, Mitry E, Guimbaud R, et al. Tritherapy with fluorouracil/leucovorin, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX): a phase II study in colorectal cancer patients with non-resectable liver metastases. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Jul 28;62(2):195–201.
 189. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial Therapy with FOLFOXIRI and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2014 Oct 23;371(17):1609–18.
 190. Masi G, Loupakis F, Salvatore L, Fornaro L, Cremolini C, Cupini S, et al. Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2010 Sep;11(9):845–52.
 191. Wong R, Cunningham D, Barbachano Y, Saffery C, Valle J, Hickish T, et al. A multicentre study of capecitabine, oxaliplatin plus bevacizumab as perioperative treatment of patients with poor-risk colorectal liver-only metastases not selected for upfront resection. *Ann Oncol*. 2011 Sep;22(9):2042–8.
 192. Gruenberger T, Bridgewater J, Chau I, García Alfonso P, Rivoire M, Mudan S, et al. Bevacizumab plus mFOLFOX-6 or FOLFOXIRI in patients with initially unresectable liver metastases from colorectal cancer: the OLIVIA multinational randomised phase II trial. *Ann Oncol*. 2015 Apr;26(4):702–8.
 193. Tomasello G, Petrelli F, Ghidini M, Russo A, Passalacqua R, Barni S. FOLFOXIRI Plus Bevacizumab as Conversion Therapy for Patients With Initially Unresectable Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2017 Jul 13;3(7):e170278.
 194. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, Raab HR, Lordick F, Hartmann JT, et al. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2010 Jan;11(1):38–47.
 195. Ji JH, Park SH, Lee J, Kim TW, Hong YS, Kim K pyo, et al. Prospective phase II study of neoadjuvant FOLFOX6 plus cetuximab in patients with colorectal cancer and unresectable liver-only metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 Jul 21;72(1):223–30.
 196. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol*. 2010 Nov 1;28(31):4697–705.
 197. Ye LC, Liu TS, Ren L, Wei Y, Zhu DX, Zai SY, et al. Randomized Controlled Trial of Cetuximab Plus Chemotherapy for Patients With KRAS Wild-Type Unresectable Colorectal Liver-Limited Metastases. *J Clin Oncol*. 2013 Jun 1;31(16):1931–8.
 198. Folprecht G, Mende M, Liersch T, Bechstein WO, Kohnen CH, Stein A, et al. Cetuximab/irinotecan/5-FU +/-oxaliplatin or FOLFOXIRI +/- bevacizumab in patients with colorectal cancer and nonresectable liver metastases (AIO CELIM2-study). *J Clin Oncol*. 2020 May 20;38(15_suppl):4024–4024.
 199. Geissler M, Martens UM, Knorrenschild R, Greeve J, Florschuetz A, Tannapfel A, et al.

- mFOLFOXIRI + panitumumab versus FOLFOXIRI as first-line treatment in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer m(CRC): A randomized phase II VOLFI trial of the AIO (AIO-KRK0109). *Ann Oncol*. 2017 Sep;28:v159.
200. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol*. 2017 Aug;28(8):1713–29.
 201. Araujo RLC, Gönen M, Herman P. Chemotherapy for Patients with Colorectal Liver Metastases Who Underwent Curative Resection Improves Long-Term Outcomes: Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2015 Sep 14;22(9):3070–8.
 202. Mauri D, Zarkavelis G, Filis P, Tsali L, Zafeiri G, Papadaki A, et al. Postoperative chemotherapy with single-agent fluoropyrimidines after resection of colorectal cancer liver metastases: a meta-analysis of randomised trials. *ESMO Open*. 2018;3(4):e000343.
 203. Kanemitsu Y, Shimizu Y, Mizusawa J, Inaba Y, Hamaguchi T, Shida D, et al. Hepatectomy Followed by mFOLFOX6 Versus Hepatectomy Alone for Liver-Only Metastatic Colorectal Cancer (JCOG0603): A Phase II or III Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol*. 2021 Dec 1;39(34):3789–99.
 204. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2021 Dec;7(1):6.
 205. Mazzaferro V, Sposito C, Coppa J, Miceli R, Bhoori S, Bongini M, et al. The Long-Term Benefit of Liver Transplantation for Hepatic Metastases From Neuroendocrine Tumors. *Am J Transplant*. 2016 Oct;16(10):2892–902.
 206. Foss A, Adam R, Dueland S. Liver transplantation for colorectal liver metastases: revisiting the concept. *Transpl Int*. 2010 Jan 12;23(7):679–85.
 207. Mühlbacher F, Huk I, Steininger R, Gnant M, Götzinger P, Wamser P, et al. Is orthotopic liver transplantation a feasible treatment for secondary cancer of the liver? *Transplant Proc*. 1991 Feb;23(1 Pt 2):1567–8.
 208. Adam R, Piedvache C, Chiche L, Salamé E, Scatton O, Granger V, et al. Chemotherapy and liver transplantation versus chemotherapy alone in patients with definitively unresectable colorectal liver metastases: A prospective multicentric randomized trial (TRANSMET). *J Clin Oncol*. 2024 Jun 1;42(16_suppl):3500–3500.
 209. Ongaro E, Cremolini C, Rossini D, Corti F, Pagani F, Morelli L, et al. Clinical and molecular determinants of extrahepatic disease progression in patients with metastatic colorectal cancer with liver-limited metastases deemed initially unresectable. *ESMO Open*. 2019;4(2).
 210. Salva F, Dopazo C, Adam R, Marques HP, Mirza D, Ferrero A, et al. Determinants of permanent liver limited disease (pLLD) in metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol*. 2023 Jun 1;41(16_suppl):3561–3561.
 211. Line PD, Ruffolo LI, Toso C, Dueland S, Nadalin S, Hernandez-Alejandro R. Liver transplantation for colorectal liver metastases: What do we need to know? *Int J Surg*. 2020 Oct;82:87–92.
 212. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst*. 2019;9(2):109–27.
 213. Salvà F, Saoudi N, Rodríguez M, Baraibar I, Ros J, García A, et al. Determinants of Metastatic Colorectal Cancer With Permanent Liver- Limited Disease. *Clin Colorectal Cancer*. 2024 Jun;
 214. Schwartz LH, Litière S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, et al. RECIST 1.1—Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer*. 2016 Jul;62:132–7.

215. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005 Mar 9;5(2):209–19.
216. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol.* 2019 Aug;30(8):1232–43.
217. Hernando-Calvo A, Vila-Casadesús M, Bareche Y, Gonzalez-Medina A, Abbas-Aghababazadeh F, Lo Giacco D, et al. A pan-cancer clinical platform to predict immunotherapy outcomes and prioritize immuno-oncology combinations in early-phase trials. *Med.* 2023 Oct;4(10):710-727.e5.
218. Zhang D, Huo D, Xie H, Wu L, Zhang J, Liu L, et al. CHG: A Systematically Integrated Database of Cancer Hallmark Genes. *Front Genet.* 2020 Feb 5;11.
219. Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Ward SA, Dunham I, Forbes SA. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2018 Nov 6;18(11):696–705.
220. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell.* 2018 Apr;173(2):321-337.e10.
221. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, Weerasinghe A, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell.* 2018 Apr;173(2):371-385.e18.
222. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell.* 2011. p. 646–74.
223. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan 1;12(1):31–46.
224. Tabernero J, Ros J, Élez E. The Evolving Treatment Landscape in BRAF-V600E –Mutated Metastatic Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ B.* 2022 Jul;(42):254–63.
225. Kim CG, Ahn JB, Jung M, Beom SH, Kim C, Kim JH, et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *Br J Cancer.* 2016 Jun 26;115(1):25–33.
226. Pham H, Ramanujam S, Yeoh HL, Antippa P, Houli N, Thomson B, et al. Evolving patterns of metastatic spread, treatment, and outcome for patients with oligometastatic colorectal cancer. *Surg Oncol Insight.* 2024 Sep;1(3):100076.
227. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep.* 2016 Jul 15;6(1):29765.
228. Estimaciones de la incidencia del cancer en españa, 2023. <https://redcan.org/storage/documents/02d62122-9adb-4d35-b6d0-551435dbe4ae.pdf>.
229. Qiu M, Hu J, Yang D, Cosgrove DP, Xu R. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget.* 2015 Nov 17;6(36):38658–66.
230. Reboux N, Jooste V, Goungounga J, Robaszkiewicz M, Nousbaum JB, Bouvier AM. Incidence and Survival in Synchronous and Metachronous Liver Metastases From Colorectal Cancer. *JAMA Netw Open.* 2022 Oct 14;5(10):e2236666.
231. Mekenkamp LJM, Koopman M, Teerenstra S, van Krieken JHJM, Mol L, Nagtegaal ID, et al. Clinicopathological features and outcome in advanced colorectal cancer patients with synchronous vs metachronous metastases. *Br J Cancer.* 2010 Jul 15;103(2):159–64.
232. Salva F. Perfil molecular y patrón de diseminación entre tumores sincrónicos (SINCR) y metacrónicos (METCR) en cáncer colorrectal metastásico (CCRm). *Congr Oncol SEOM.*
233. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, Sinha R, Zeng Z, Shia J, et al. Comparative Genomic Analysis of Primary Versus Metastatic Colorectal Carcinomas. *J Clin Oncol.* 2012 Aug 20;30(24):2956–62.

234. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 19;487(7407):330–7.
235. Pereira AAL, Rego JFM, Morris V, Overman MJ, Eng C, Garrett CR, et al. Association between KRAS mutation and lung metastasis in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015 Feb 23;112(3):424–8.
236. Passot G, Kim BJ, Glehen O, Mehran RJ, Kopetz SE, Goere D, et al. Impact of RAS Mutations in Metastatic Colorectal Cancer After Potentially Curative Resection: Does Site of Metastases Matter? *Ann Surg Oncol*. 2018 Jan 25;25(1):179–87.
237. Tie J, Lipton L, Desai J, Gibbs P, Jorissen RN, Christie M, et al. KRAS Mutation Is Associated with Lung Metastasis in Patients with Curatively Resected Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Mar 1;17(5):1122–30.
238. Hu CT, Wang JL, Hou T, Yan ZW, Zu LD, Fu GH, et al. Comprehensive Mutation Profiling of Colorectal Cancer Patients With Lung or Liver Metastasis by Targeted Next-Generation Sequencing. *Technol Cancer Res Treat*. 2023 Jan 2;22.
239. Wang C, Ouyang C, Cho M, Ji J, Sandhu J, Goel A, et al. Wild-type APC Is Associated with Poor Survival in Metastatic Microsatellite Stable Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2021 Mar 1;26(3):208–14.
240. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
241. Kim JE, Chun SM, Hong YS, Kim K pyo, Kim SY, Kim J, et al. Mutation Burden and I Index for Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagnostics*. 2019 Mar;21(2):241–50.
242. Ros J, Balconi F, Baraibar I, Saoudi Gonzalez N, Salva F, Tabernero J, et al. Advances in immune checkpoint inhibitor combination strategies for microsatellite stable colorectal cancer. *Front Oncol*. 2023 Feb 2;13.
243. Sahin IH, Ciombor KK, Diaz LA, Yu J, Kim R. Immunotherapy for Microsatellite Stable Colorectal Cancers: Challenges and Novel Therapeutic Avenues. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2022 Jul;(42):242–53.
244. Ros J, Baraibar I, Saoudi N, Rodriguez M, Salvà F, Tabernero J, et al. Immunotherapy for Colorectal Cancer with High Microsatellite Instability: The Ongoing Search for Biomarkers. *Cancers (Basel)*. 2023 Aug 24;15(17):4245.
245. García-Mulero S, Alonso MH, Pardo J, Santos C, Sanjuan X, Salazar R, et al. Lung metastases share common immune features regardless of primary tumor origin. *J Immunother Cancer*. 2020 Jun;8(1):e000491.
246. Mezheyski A, Micke P, Martín-Bernabé A, Backman M, Hrynchyk I, Hammarström K, et al. The Immune Landscape of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 4;13(21):5545.
247. Diaz LA, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2022 May;23(5):659–70.
248. Andre T, Elez E, Van Cutsem E, Jensen LH, Bennouna J, Mendez G, et al. Nivolumab (NIVO) plus ipilimumab (IPI) vs chemotherapy (chemo) as first-line (1L) treatment for microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC): First results of the CheckMate 8HW study. *J Clin Oncol*. 2024 Jan 20;42(3_suppl):LBA768–LBA768.
249. Overman MJ, Gelsomino F, Aglietta M, Wong M, Limon Miron ML, Leonard G, et al. Nivolumab plus relatlimab in patients with previously treated microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient

- metastatic colorectal cancer: the phase II CheckMate 142 study. *J Immunother Cancer*. 2024 May 31;12(5):e008689.
250. de Andrea CE, Schalper KA, Sanmamed MF, Melero I. Immunodivergence in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Dec;34(6):876–8.
 251. Van den Eynde M, Mlecnik B, Bindea G, Fredriksen T, Church SE, Lafontaine L, et al. The Link between the Multiverse of Immune Microenvironments in Metastases and the Survival of Colorectal Cancer Patients. *Cancer Cell*. 2018 Dec;34(6):1012-1026.e3.
 252. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018 May;391(10135):2128–39.
 253. Zeineddine FA, Zeineddine MA, Yousef A, Gu Y, Chowdhury S, Dasari A, et al. Survival improvement for patients with metastatic colorectal cancer over twenty years. *npj Precis Oncol*. 2023 Feb 13;7(1):16.
 254. Moretto R, Germani MM, Borelli B, Conca V, Rossini D, Boraschi P, et al. Predicting early recurrence after resection of initially unresectable colorectal liver metastases: the role of baseline and pre-surgery clinical, radiological and molecular factors in a real-life multicentre experience. *ESMO Open*. 2024 Apr;9(4):102991.
 255. Gofrit ON, Gofrit B, Goldberg SN, Popovtzer A, Sosna J, Hubert A. The varied clonal trajectory of liver and lung metastases of colorectal cancer. *Adv Cancer Biol - Metastasis*. 2024 Oct;11:100122.
 256. Ottaiano A, Santorsola M, Caraglia M, Circelli L, Gigantino V, Botti G, et al. Genetic regressive trajectories in colorectal cancer: A new hallmark of oligo-metastatic disease? *Transl Oncol*. 2021 Aug;14(8):101131.

11. ANEXO

11. ANEXO

Este anexo resume los genes incluidos en los distintos análisis realizados, organizados según la técnica empleada.

1. Panel de genes incluidos en el Panel VHIO card-300

Panel VHIO card-300

ABL1	BRAF	CSF1R	EZH2	GATA6	IRS1	MDM2	PAK3	PRKCI	RUNX1T1	TERT
ABL2	BRCA1	CTCF	FAM175A	GID4	IRS2	MDM4	PAK7	PRKDC	RYBP	TET1
ACVR1B	BRCA2	CTLA4	FAM46C	GLI1	JAK1	MED12	PALB2	PRSS8	SDHA	TET2
AKT1	BRD4	CTNNA1	FANCA	GNA11	JAK2	MEF2B	PARK2	PTCH1	SDHAF2	TGFBR1
AKT2	BRIP1	CTNNB1	FANCC	GNA13	JAK3	MEN1	PARP1	PTEN	SDHB	TGFBR2
AKT3	BTG1	CUL3	FANCD2	GNAQ	JUN	MET	PAX5	PTPN11	SDHC	TMEM127
ALK	BTB	CYLD	FANCE	GNAS	KAT6A	MITF	PBRM1	PTPRD	SDHD	TMPRSS2
ALOX12B	C11ORF30	DAXX	FANCF	GPR124	KDM5A	MLH1	PDCD1	PTPRS	SETD2	TNFAIP3
AMER1	CARD11	DCUN1D1	FANCG	GREM1	KDM5C	MPL	PDCD1LG2	PTPRT	SF3B1	TNFRSF14
APC	CASP8	DDR2	FANCL	GRIN2A	KDM6A	MRE11A	PDGFRA	QKI	SH2D1A	TOP1
AR	CBFB	DICER1	FANCM	GRM3	KDR	MSH2	PDGFRB	RAC1	SHH	TOP2A
ARAF	CBL	DIS3	FAS	GSK3B	KEAP1	MSH6	PDK1	RAD50	SHQ1	TP53
ARFRP1	CCND1	DNMT1	FAT1	H3F3A	KEL	MTOR	PDPK1	RAD51	SLIT2	TP63
ARID1A	CCND2	DNMT3A	FBXW7	H3F3C	KIT	MUTYH	PHOX2B	RAD51B	SMAD2	TRAF7
ARID1B	CCND3	DNMT3B	FGF10	HGF	KLF4	MYC	PIK3C2B	RAD51C	SMAD3	TSC1
ARID2	CCNE1	DOT1L	FGF14	HIST1H1C	KLHL6	MYCL	PIK3C2G	RAD51D	SMAD4	TSC2
ARID5B	CD274	E2F3	FGF19	HIST1H2BD	KMT2A	MYCL1	PIK3C3	RAD52	SMARCA4	TSHR
ASXL1	CD276	EED	FGF23	HIST1H3B	KMT2C	MYCN	PIK3CA	RAD54L	SMARCB1	U2AF1
ASXL2	CD79A	EGFL7	FGF3	HNF1A	KMT2D	MYD88	PIK3CB	RAF1	SMARCD1	VEGFA
ATM	CD79B	EGFR	FGF4	HRAS	KRAS	MYOD1	PIK3CD	RANBP2	SMO	VHL
ATR	CDC73	EIF1AX	FGF6	HSD3B1	LATS1	NBN	PIK3CG	RARA	SNCAIP	VTCN1
ATRX	CDH1	EP300	FGFR1	HSP90AA1	LATS2	NCOR1	PIK3R1	RASA1	SOC1	WISP3
AURKA	CDK12	EPCAM	FGFR2	ICOSLG	LMO1	NF1	PIK3R2	RB1	SOX10	WT1
AURKB	CDK4	EPHA3	FGFR3	IDH1	LRP1B	NF2	PIK3R3	RBM10	SOX17	XIAP
AXIN1	CDK6	EPHA5	FGFR4	IDH2	LYN	NFE2L2	PIM1	RECQL4	SOX2	XPO1
AXIN2	CDK8	EPHA7	FH	IFNGR1	LZTR1	NFKBIA	PLCG2	REL	SOX9	YAP1
AXL	CDKN1A	EPHB1	FLCN	IGF1	MAD2L2	NKX2-1	PLK2	RET	SPEN	YES1
B2M	CDKN1B	ERBB2	FLT1	IGF1R	MAGI2	NKX3-1	PMAIP1	RFWD2	SPOP	ZBTB2
BAP1	CDKN2A	ERBB3	FLT3	IGF2	MALT1	NOTCH1	PMS1	RHEB	SPTA1	ZNF217
BARD1	CDKN2B	ERBB4	FLT4	IKBKE	MAP2K1	NOTCH2	PMS2	RHOA	SRC	ZNF703
BBC3	CDKN2C	ERCC2	FOXA1	IKZF1	MAP2K2	NOTCH3	PNRC1	RICTOR	STAG2	
BCL2	CEBPA	ERCC3	FOXL2	IL10	MAP2K4	NOTCH4	POLD1	RIT1	STAT3	
BCL2L1	CHD2	ERCC4	FOXP1	IL7R	MAP3K1	NPM1	POLE	RNF43	STAT4	
BCL2L11	CHD4	ERCC5	FRS2	INHBA	MAP3K13	NRAS	POLR3A	RNPC3	STK11	
BCL2L2	CHEK1	ERG	FUBP1	INPP4A	MAP3K5	NSD1	POLR3B	ROS1	STK40	
BCL6	CHEK2	ERRF1	GABRA6	INPP4B	MAPK1	NTRK1	PPP2R1A	RPS6KA4	SUFU	
BCOR	CIC	ESR1	GATA1	INSR	MAPK7	NTRK2	PPP2R2A	RPS6KB2	SUZ12	
BCORL1	CREBBP	ETV1	GATA2	IRAK4	MAX	NTRK3	PRDM1	RPTOR	SYK	
BLM	CRKL	ETV6	GATA3	IRF2	MCL1	NUP93	PREX2	RSPO2	TAF1	
BMPRI1A	CRLF2	EXOSC10	GATA4	IRF4	MDC1	PAK1	PRKAR1A	RUNX1	TBX3	

2. Panel de genes incluidos en el Panel Amplicon Hiplex

Panel General Amplicon Hiplex					
ABL1	EGFR	GNAQ	MET	PDGFRA	STK11
AKT1	ERBB2	GNAS	MLH1	PIK3CA	TP53
AKT2	ERBB3	HRAS	MPL	PIK3R1	VHL
AKT3	ESR1	IDH1	MSH6	PIK3R5	RNF43
ALK	FBXW7	IDH2	MYC	PTEN	ZNRF3
APC	FGFR1	JAK1	NF2	RB1	
BRAF	FGFR2	JAK3	NOTCH1	RET	
CDH1	FGFR3	KIT	NOTCH2	RUNX1	
CDKN2A	FLT3	KRAS	NOTCH3	SMAD4	
CSF1R	GATA1	MAG	NOTCH4	SMARCB1	
CTNNB1	GNA11	MAP2K1	NRAS	SRC	

3. Panel de genes analizados en mediante VIGex

VIGex (RNA-seq)		
CXCL9	CXCL10	CXCL11
GZM1	GZMBJ	PDCD1
IFNG	PRF1	IL7R
CTLA-4	CD274	FOXP3