UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

Desarrollo y validación analítica de métodos basados en la detección de ADN libre circulante en el contexto de cribado de cáncer colorrectal

Francisco José Illana Cámara

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

Esta tesis ha sido realizada en el Servicio de Bioquimica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Desarrollo y validación analítica de métodos basados en la detección de ADN libre circulante en el contexto de cribado de cáncer colorrectal

Francisco José Illana Cámara

Doctoral Program in Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2026

Directores de la tesis:

Dr. Francisco Blanco Vaca

Dra. Josefina Mora Brugués

A Marta, mi compañera de camino

Tabla de contenidos

Tabla de contenidos **5**
Índice de figuras **11**
Índice de tablas **15**
Abreviaturas **19**
ABSTRACT **23**
RESUM **27**
RESUMEN **31**
Introducción **35**
1. Epidemiologia y factores de riesgo del cáncer colorrectal 37
1.1. Incidencia y mortalidad 37
1.2. Factores de riesgo 38
2. Fisiopatología del cáncer colorrectal 40
2.1. Homeostasis del epitelio colorrectal 40
2.2. Secuencia adenoma–carcinoma y progresión tumoral 42
2.3. Bases moleculares de la carcinogénesis colorrectal 44
2.3.1. El oncogén *RAS* en el cáncer colorrectal 47
2.3.2. Alteraciones epigenéticas en cáncer colorrectal 48
3. Diagnóstico y cribado del cáncer colorrectal 49
3.1. Presentación clínica 49
3.2. Pruebas diagnósticas y estadiaje 50
3.3. Cribado del cáncer colorrectal 52
4. Biomarcadores no invasivos para la detección y seguimiento del cáncer colorrectal 54
4.1. Pruebas basadas en sangre oculta en heces 55
4.2. Test moleculares en heces 56
4.3. Biomarcadores en sangre basados en ADN libre circulante y otros marcadores séricos 58
4.3.1. ADN libre circulante y ADN tumoral circulante 58
4.3.2. Biomarcadores en fase de desarrollo y relevancia traslacional 60
4.3.3. Pruebas en sangre con validación poblacional en cribado 63
4.3.4. Marcadores tumorales en suero 66
4.3.4.1. Antígeno carcinoembrionario 67
4.3.4.2. Antígeno carbohidrato 19.9 68
5. Estrategias secuenciales de cribado del cáncer colorrectal 68
Hipótesis y objetivos **71**
Material y métodos **75**

1. Diseño del estudio clínico 77
1.1. Población de estudio y clasificación clínica 77
1.2. Obtención y manejo de muestras 80
1.3. Extracción de ADN libre circulante a partir de plasma 81
1.4. Cuantificación del ADN 81
1.5. Selección de marcadores epigenéticos 82
2. Estudio de marcadores de metilación en cfDNA 85
2.1. Conversión con bisulfito de ADN extraído 85
2.2. Preamplificación por PCR 85
2.3. Análisis de marcadores por PCR digital 86
2.4. Controles de metilación positivos y negativos 87
3. Estudio de mutaciones en *KRAS* en cfDNA 88
3.1. Análisis por PCR digital de *KRAS* 88
3.2. Controles positivos y negativos de *KRAS* 90
4. Marcadores tumorales en suero 90
5. Detección de sangre oculta en heces 91
6. Análisis de datos 92
7. Aspectos éticos 93
Resultados 95
1. Primer objetivo: Desarrollar y optimizar un procedimiento de análisis de cfDNA basado en un panel de biomarcadores epigenéticos seleccionados para la detección de CCR y lesiones precursoras avanzadas mediante ddPCR 97
1.1. Optimización de condiciones para la amplificación de las regiones seleccionadas 97
1.2. Verificación de la especificidad de las sondas marcadas 99
1.3. Evaluación de la sensibilidad analítica del método en muestras de plasma 102
1.4. Evaluación de la sensibilidad analítica en plasma tras la optimización del proceso por preamplificación de la muestra 104
1.5. Definición de umbrales de positividad del panel de marcadores epigenéticos.... 105
1.6. Evaluación del panel de metilación en muestras con ctDNA confirmado por secuenciación masiva 106
2. Segundo objetivo: Desarrollar un ensayo multiplex de ddPCR para la detección de mutaciones frecuentes de *KRAS* en cfDNA. 108
2.1. Evaluación de la especificidad analítica del ensayo multiplex para variantes de *KRAS* 108
2.2. Evaluación de la sensibilidad analítica del ensayo multiplex de *KRAS* 110
3. Tercer objetivo: Evaluar el rendimiento diagnóstico de los métodos desarrollados, en términos de sensibilidad y especificidad, en un estudio clínico piloto para la detección de CCR y lesiones precursoras avanzadas. 112

3.1. Características clínicas y demográficas de la población 112
3.2. Población de estudio para el análisis de marcadores epigenéticos en cfDNA 119
3.3. Población de estudio para el análisis de mutaciones de *KRAS* en cfDNA 119
3.4. Comparación de la concentración de cfDNA entre grupos clínicos 120
3.5. Sensibilidad y especificidad del análisis de biomarcadores epigenéticos 121
3.5.1. Rendimiento diagnóstico del panel de metilación para la detección de adenomas avanzados 123
3.5.2. Rendimiento diagnóstico del panel de metilación para la detección de cáncer colorrectal 124
3.5.3. Rendimiento diagnóstico del panel de metilación para la detección de neoplasia avanzada 125
3.5.4. Rendimiento diagnóstico del panel de metilación para la detección de cáncer colorrectal en estadios iniciales y avanzados 126
3.5.5. Valores predictivos ajustados por prevalencia 128
3.5.6. Evaluación de puntos de corte alternativos para los marcadores epigenéticos en plasma 129
3.5.7. Comparación de rendimientos analiticos basados en límite de detección y puntos de corte 132
3.6. Rendimiento diagnóstico del análisis de mutaciones en *KRAS* 133
4. Cuarto objetivo: Evaluar de forma exploratoria la relación entre los biomarcadores moleculares detectados en cfDNA y los resultados de pruebas no invasivas utilizadas en el contexto del CCR, incluyendo la sangre oculta en heces y los marcadores séricos CEA y CA 19-9. 134
4.1. Rendimiento diagnóstico de la sangre oculta en heces 134
4.2. Rendimiento diagnóstico del CEA en suero para la detección precoz de lesiones avanzadas 135
4.2.1. Evaluación de otros puntos de corte para el CEA 136
4.3. Análisis de CA 19-9 sérico 137
4.4. Comparación global entre marcadores epigenéticos y marcadores séricos convencionales 137
Discusión 141
Conclusiones 169
Referencias 173
Anexos 201
Anexo I 203
Anexo II 210
Anexo III 212
Agradecimientos 215

Índice de figuras

Figura 1. Principales factores de riesgo asociados al cáncer colorrectal 40

Figura 2. Organización del epitelio colónico y dinámica celular en las criptas intestinales 41

Figura 3. Secuencia adenoma-carcinoma en el CCR. 43

Figura 4. Carcinogénesis colorrectal y subtipos moleculares.....46

Figura 5. Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes procedentes del Programa de Cribado de CCR y recogida de muestras.....77

Figura 6. Distribución de los valores de metilación (β-values) de CpG en los promotores de los genes SEPT9, SDC2, EYA4, ITGA4, MAP3K y PRIMA1 en muestras de mucosa colónica normal y tumoral de CCR en The Cancer Genoma Atlas (TCGA) obtenidos en la plataforma Wanderer.....83

Figura 7. Optimización y verificación de la amplificación de la región diana del marcador SEPT9.....98

Figura 8. Optimización de las condiciones de amplificación de las regiones diana del resto de marcadores.....99

Figura 9. Verificación de la especificidad de la sonda marcada para SEPT9 mediante PCR digital.....100

Figura 10. Verificación de la especificidad de las sondas marcadas para los marcadores en EYA4, SDC2, ITGA4, MAP3K14-AS1 y PRIMA1 mediante PCR digital.....101

Figura 11. Detección de marcadores epigenéticos en muestras de cfDNA de pacientes con CCR metastásico con ctDNA previamente confirmado por NGS.....107

Figura 12. Verificación de la especificidad de las sondas marcadas para las mutaciones de KRAS mediante PCR digital.....109

Figura 13. Distribución de cohortes según hallazgos colonoscópicos y nuevos diagnósticos de CCR.....112

Figura 14. Distribución de los porcentajes de metilación de los biomarcadores epigenéticos.....129

Figura 15. Representación individual de los niveles séricos de CEA y del perfil de metilación en cfDNA en pacientes con valores elevados de CEA (>5 ng/mL).....138

Figura 16. Representación individual de los niveles séricos de CEA y del perfil de metilación en cfDNA en pacientes con valores de CEA dentro del rango de normalidad (<5 ng/mL) y positividad para al menos dos biomarcadores epigenéticos.....139

Figura 17. Resultados del panel de biomarcadores epigenéticos en individuos positivos a CA 19-9.....139

Índice de tablas

Índice de tablas

Tabla 1. Rendimiento diagnóstico de biomarcadores basados en cfDNA para la detección precoz de CCR en estudios representativos……66

Tabla 2. Cebadores y sondas utilizados para la detección de biomarcadores metilados mediante ddPCR..84

Tabla 3. Cebadores y sondas utilizados para la detección de mutaciones en KRAS mediante ddPCR. Secuencia de cebadores (C) y sondas (S) LNA específicas para las variantes de KRAS analizadas……89

Tabla 4. Resultados obtenidos en muestras de individuos en las condiciones iniciales……..103

Tabla 5. Resultados obtenidos en los controles negativos de metilación analizados en diez tandas independientes……105

Tabla 6. Resultados obtenidos en los controles negativos de KRAS analizados en cinco series independientes……110

Tabla 7. Características demográficas de la población de estudio……113

Tabla 8. Resumen histopatológico de la cohorte procedente del programa de cribado de CCR……..114

Tabla 9. Características clinicopatológicas de la cohorte de pacientes con CCR reclutados en la Consulta de Diagnóstico y Tratamiento Rápido ……114

Tabla 10. Resultados individualizados de la colonoscopia de la cohorte procedente del programa de cribado de CCR……116

Tabla 11. Características clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con CCR……117

Tabla 12. Comparación de la concentración de cfDNA entre grupos diagnósticos……120

Tabla 13. Resultados de concentración de cfDNA y positividad para los marcadores de metilación.....122

Tabla 14. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de AA……124

Tabla 15. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de CCR……125

Tabla 16. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de neoplasia avanzada……126

Tabla 17. Sensibilidad de biomarcadores y paneles según estadio de CCR……127

Tabla 18. Valores predictivos del panel de biomarcadores ajustados por la prevalencia en individuos con SOH positivo derivados de programas de cribado ……128

Tabla 19. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de neoplasia avanzada con puntos de corte alternativos de metilación……130

Tabla 20. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de CCR……131

Tabla 21. Rendimiento diagnóstico de los modelos para la detección de neoplasia avanzada……132

Tabla 22. Estado mutacional de KRAS en cfDNA en los distintos grupos de estudio……..133

Tabla 23: Rendimiento diagnóstico de la SOH en la cohorte estudiada……..134

Tabla 24. Distribución de los niveles séricos de CEA según grupo diagnóstico……..135

Tabla 25. Rendimiento diagnóstico del CEA ……..136

Tabla 26. Rendimiento diagnóstico del CEA con el punto de corte de 3 µg/L ……..136

Abreviaturas

Abreviatura	Definición
AA	Adenomas avanzados
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AUC	Área bajo la curva
CA 19-9	Antígeno carbohidrato 19-9
CEA	Antígeno carcinoembrionario
cfDNA	ADN libre circulante
CCR	Cáncer colorrectal
CIMP	Fenotipo hipermetilador de islas CpG
CIN	Inestabilidad cromosómica (Chromosomal Instability)
CMS	Subtipos moleculares consensuados (Consensus Molecular Subtypes)
ctDNA	ADN tumoral circulante
ddPCR	PCR digital en gotas (*droplet digital* PCR)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio-mesénquima
FDA	Food and Drug Administration
FIT	Test inmunoquímico fecal (Fecal Immunochemical Test)
gFOBT	Test de sangre oculta en heces basado en guayaco
Hb/g	Hemoglobina por gramo
LOH	Pérdida de heterocigosidad (Loss of Heterozygosity)
MMR	Sistema de reparación de errores de apareamiento (Mismatch Repair)
MRD	Enfermedad mínima residual (Minimal Residual Disease)
MSI	Inestabilidad de microsatélites (Microsatellite Instability)
MSI-H	Inestabilidad de microsatélites de alto grado
NA	Neoplasia avanzada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QALY	Año de vida ajustado por calidad (Quality-Adjusted Life Year)

RI	Rango intercuartílico
ROC	Receiver Operating Characteristic
ARN	Ácido ribonucleico
SOH	Sangre oculta en heces
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TNM	Tumor, Node, Metastasis
UICC	Union for International Cancer Control
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

ABSTRACT

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer incidence and mortality worldwide. Early detection is a key factor in improving prognosis. However, current screening strategies, such as fecal occult blood testing and colonoscopy, present important limitations, including suboptimal sensitivity for the detection of precursor lesions, the invasive nature of colonoscopy, and adherence-related issues within the population. In recent years, the analysis of biomarkers in circulating cell-free DNA (cfDNA) has emerged as a promising alternative for the development of non-invasive diagnostic tools.

The aim of this thesis was to develop and analytically validate cfDNA-based methods for the early detection of CRC. To this end, a study with both methodological and clinical approaches was designed. Two droplet digital PCR (ddPCR)-based approaches were developed: a panel of epigenetic biomarkers targeting genes associated with colorectal carcinogenesis (*SEPT9, EYA4, SDC2, ITGA4, MAP3K14-AS1*, and *PRIMA1*) and a multiplex assay for the detection of the most frequent *KRAS* mutations in CRC. Analytical validation included sensitivity, specificity, and limit of detection, and the diagnostic performance of the methods was subsequently evaluated in a pilot study using samples obtained from screening programs and clinical practice.

The results showed that the diagnostic performance of the epigenetic panel depended on the positivity criteria applied. The strategy based on the detection of at least one biomarker achieved a sensitivity of 74.2% for CRC and 66.7% for precancerous lesions, with a specificity of 69.2% in both analyses. In contrast, positivity for two or more biomarkers increased specificity to over 90%, at the expense of a significant reduction in sensitivity. *KRAS* mutation detection showed a sensitivity of 8.3% and a specificity of 100% in the analyzed cohort.

Overall, the developed methods demonstrate the feasibility of cfDNA analysis as a non-invasive diagnostic approach, although their current performance remains insufficient for population-based screening. Nevertheless, these findings reinforce the potential of cfDNA as a source of

biomarkers and support the development of combined approaches to improve the diagnostic accuracy of CRC.

RESUM

Resum

El càncer colorectal (CCR) constitueix una de les principals causes d'incidència i mortalitat per càncer a nivell mundial. La detecció precoç és un factor determinant per millorar el pronòstic. No obstant això, les estratègies actuals de cribratge, com la prova de sang oculta en femta i la colonoscòpia, presenten limitacions rellevants, entre les quals s'inclouen una sensibilitat subòptima per a la detecció de lesions precursores, el caràcter invasiu de la colonoscòpia i problemes d'adherència en la població. En els darrers anys, l'anàlisi de biomarcadors en ADN lliure circulant (cfDNA) ha emergit com una alternativa prometedora per al desenvolupament d'eines diagnòstiques no invasives.

L'objectiu d'aquesta tesi va ser desenvolupar i validar analíticament mètodes basats en cfDNA per a la detecció precoç del CCR. Amb aquesta finalitat, es va dissenyar un estudi amb un enfocament metodològic i clínic. Es van desenvolupar dues aproximacions basades en PCR digital en gotes (ddPCR): un panell de biomarcadors epigenètics dirigits a gens associats amb la carcinogènesi colorectal (*SEPT9, EYA4, SDC2, ITGA4, MAP3K14-AS1* i *PRIMA1*) i un assaig multiplex per a la detecció de les mutacions més freqüents de *KRAS* en el CCR. La validació analítica va incloure l'avaluació de la sensibilitat, l'especificitat i el límit de detecció, i posteriorment el seu rendiment diagnòstic es va analitzar en un estudi pilot amb mostres procedents de programes de cribratge i de l'àmbit assistencial.

Els resultats van mostrar que el rendiment diagnòstic del panell epigenètic depèn del criteri de positivitat aplicat. L'estratègia basada en la detecció d'almenys un biomarcador va assolir una sensibilitat del 74,2% per a la detecció de CCR i del 66,7% per a lesions precanceroses, amb una especificitat comuna del 69,2% en ambdues anàlisis. Per contra, la positivitat de dos o més biomarcadors va incrementar l'especificitat per sobre del 90%, a costa d'una reducció significativa de la sensibilitat. La detecció de mutacions en *KRAS* va mostrar una sensibilitat del 8,3% i una especificitat del 100% en la cohort analitzada.

En conjunt, els mètodes desenvolupats demostren la viabilitat de l'anàlisi de cfDNA com a estratègia diagnòstica no invasiva, tot i que el seu rendiment actual és insuficient per a la seva aplicació en el cribratge poblacional. No obstant això, aquests resultats reforcen el potencial del cfDNA com a font de biomarcadors i donen suport al desenvolupament d'estratègies combinades orientades a millorar la sensibilitat i l'especificitat diagnòstica del CCR.

RESUMEN

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) constituye una de las principales causas de incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial. La detección precoz es un factor determinante para mejorar el pronóstico. Sin embargo, las estrategias actuales de cribado, como la prueba de sangre oculta en heces y la colonoscopia, presentan limitaciones relevantes, entre las que se incluyen una sensibilidad subóptima para la detección de lesiones precursoras, el carácter invasivo de la colonoscopia y problemas de adherencia en la población. En los últimos años, el análisis de biomarcadores en ADN libre circulante (cfDNA) ha emergido como una alternativa prometedora para el desarrollo de herramientas de diagnóstico no invasivo.

El objetivo de esta tesis fue desarrollar y validar analíticamente métodos basados en cfDNA para la detección precoz del CCR. Para ello, se diseñó un estudio con un enfoque metodológico y clínico. Se desarrollaron dos aproximaciones basadas en PCR digital en gotas (ddPCR): un panel de biomarcadores epigenéticos dirigidos a genes asociados con la carcinogénesis colorrectal (*SEPT9, EYA4, SDC2, ITGA4, MAP3K14-AS1* y *PRIMA1*) y un ensayo multiplex para la detección de las mutaciones más frecuentes de *KRAS* en CCR. La validación analítica incluyó la evaluación de la sensibilidad, la especificidad y el límite de detección, y su rendimiento diagnóstico se analizó posteriormente en un estudio piloto con muestras procedentes de programas de cribado y del ámbito asistencial.

Los resultados mostraron que el rendimiento diagnóstico del panel epigenético depende del criterio de positividad aplicado. La estrategia basada en la detección de al menos un biomarcador permitió alcanzar una sensibilidad del 74,2% para CCR y del 66,7% para lesiones precancerosas, con una especificidad del 69,2% en ambos análisis. Por el contrario, la positividad de dos o más biomarcadores incrementó la especificidad por encima del 90%, a expensas de una reducción significativa de la sensibilidad. La detección de mutaciones en *KRAS* mostró una sensibilidad del 8,3% y una especificidad del 100% en la cohorte analizada.

En conjunto, los métodos desarrollados demuestran la viabilidad del análisis de cfDNA como estrategia de diagnóstico no invasivo, aunque su rendimiento actual es insuficiente para su aplicación en cribado poblacional. No obstante, estos resultados refuerzan el potencial del cfDNA como fuente de biomarcadores y apoyan el desarrollo de estrategias combinadas orientadas a mejorar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del CCR.

Introducción

1. Epidemiologia y factores de riesgo del cáncer colorrectal

1.1. Incidencia y mortalidad

El cáncer colorrectal (CCR) representa un importante problema de salud pública a nivel mundial. En el año 2022, se estimaron a nivel mundial más de 1,9 millones de nuevos casos de CCR (incluídos los cánceres de colon, recto y ano) y alrededor de 904.000 muertes (1). Estas cifras representan aproximadamente uno de cada diez diagnósticos y fallecimientos por cáncer en el mundo. El CCR ocupa el tercer lugar en incidencia global y el segundo en mortalidad, solo superado por el cáncer de pulmón. Por sexos, el CCR ocupa la tercera posición entre los cánceres más frecuentes en hombres, por detrás del cáncer de pulmón y de próstata, y la segunda posición en mujeres, tras el cáncer de mama (1). La incidencia es aproximadamente un 30% superior en hombres que en mujeres, con localizaciones de tumor que varían según el sexo y edad (2).

Las tasas de incidencia del CCR son entre tres y cuatro veces superiores en regiones con ingresos económicos elevados, que han completado la transición epidemiológica hacia un predominio de enfermedades no transmisibles, como Europa, Australia/Nueva Zelanda y Norteamérica, en comparación con regiones en transición, como Europa del Este, el Sudeste y Sur-Centro de Asia, y Sudamérica. Sin embargo, esta diferencia es menos pronunciada al considerar la mortalidad, debido a una mayor letalidad relativa en estas últimas regiones (1). A nivel global, la incidencia del CCR continúa en aumento en los países en transición, probablemente como consecuencia de cambios en la dieta, el estilo de vida y el incremento en la prevalencia de obesidad. En los países de ingresos altos, en cambio, las tasas de mortalidad han disminuido, en parte debido a la mejora de los programas de cribado y de los tratamientos disponibles.

La edad es el principal factor de riesgo para el CCR esporádico y la mayoría de los casos se diagnostican después de los 50 años, lo que refuerza el papel del envejecimiento poblacional

como uno de los principales determinantes del incremento de la incidencia la enfermedad en el futuro. No obstante, se ha observado en los últimos años un incremento de los casos de CCR de aparición temprana con diagnósticos antes de los 50 años, especialmente en los países de ingresos económicos elevados (2,3). Debido a esto, la mediana de edad al momento del diagnóstico ha disminuido de 72 años a principios de la década de 2000 a 66 años en la actualidad (3). Las proyecciones indican que para el año 2030, uno de cada diez cánceres de colon y uno de cada cuatro cánceres de recto se presentarán en individuos menores de 50 años (4,5). Las razones que se encuentran tras estos CCR de inicio temprano pueden ser multifactoriales, con contribuciones que van desde la influencia genéticas, ambientales y hábitos de vida (6).

Las proyecciones realizadas por GLOBOCAN (1) indican que, debido al crecimiento y envejecimiento de la población mundial, el número absoluto de casos y muertes por CCR continuará aumentando en las próximas décadas, incluso en escenarios donde las tasas ajustadas por edad se mantengan estables o disminuyan ligeramente en algunos países de altos ingresos. Estos datos subrayan la necesidad de reforzar estrategias globales de prevención primaria, cribado poblacional y diagnóstico precoz.

1.2. Factores de riesgo

El desarrollo del CCR resulta de la interacción entre factores genéticos, clínicos, ambientales y de estilo de vida. Aunque la susceptibilidad hereditaria confiere los mayores incrementos de riesgo individual, la mayoría de los CCR son esporádicos, y están relacionados con exposiciones ambientales y hábitos adquiridos a lo largo de la vida.

Los factores genéticos desempeñan un papel relevante en la susceptibilidad al CCR. Estudios recientes han mostrado que aproximadamente el 9,9 % de los individuos con CCR son portadores mutaciones germinales en genes de susceptibilidad al cáncer, muchas de ellas en

genes que no están relacionados con los síndromes hereditarios clásicos, como el síndrome de Lynch y la poliposis adenomatosa familiar (7). Por otro lado, una historia personal o familiar de CCR o de adenomas avanzados (AA) incrementa de forma significativa el riesgo de CCR, principalmente si el diagnóstico ocurrió antes de los 50 años o si existen múltiples familiares afectados (8,9).

La enfermedad inflamatoria intestinal se asocia a un aumento sustancial del riesgo de CCR, que depende de la duración, extensión y de la actividad inflamatoria. La pancolitis, que afecta a todo el colon, confiere un incremento del riesgo entre 5 y 15 veces en comparación con la incidencia esperada en la población general, frente a un incremento aproximado de tres veces en los casos de enfermedad limitada al colon izquierdo (10,11). De forma similar, la exposición previa a radioterapia abdominopélvica, particularmente durante la infancia o juventud, se ha relacionado con un mayor riesgo de CCR (12).

La edad constituye uno de los principales determinantes del riesgo de CCR, de tal forma que los individuos mayores de 50 años concentran más del 90% de todos los casos de CCR (13). No obstante, el incremento de incidencia del CCR antes de los 50 años, ha supuesto la reducción de la edad de inicio del cribado poblacional a los 45 años en varias guías internacionales.

Además de las diferencias previamente comentadas por sexo, existen diferencias relevantes según raza o grupo étnico, con tasas de incidencia y mortalidad más elevadas en determinadas poblaciones, probablemente relacionadas con desigualdades en la exposición a factores de riesgo y en el acceso al cribado (14). Otras condiciones clínicas, como la fibrosis quística (15), la acromegalia y el trasplante renal, también se asocian a un mayor riesgo de CCR (15–17).

Otros factores de riesgo moderados que no suelen modificar de manera aislada las recomendaciones de cribado son la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, el sedentarismo, el consumo de tabaco y el consumo elevado de alcohol (18–21). En relación a la alimentación, la

ingesta habitual de carnes procesadas y carne roja se asocia con un incremento del riesgo de CCR (22).

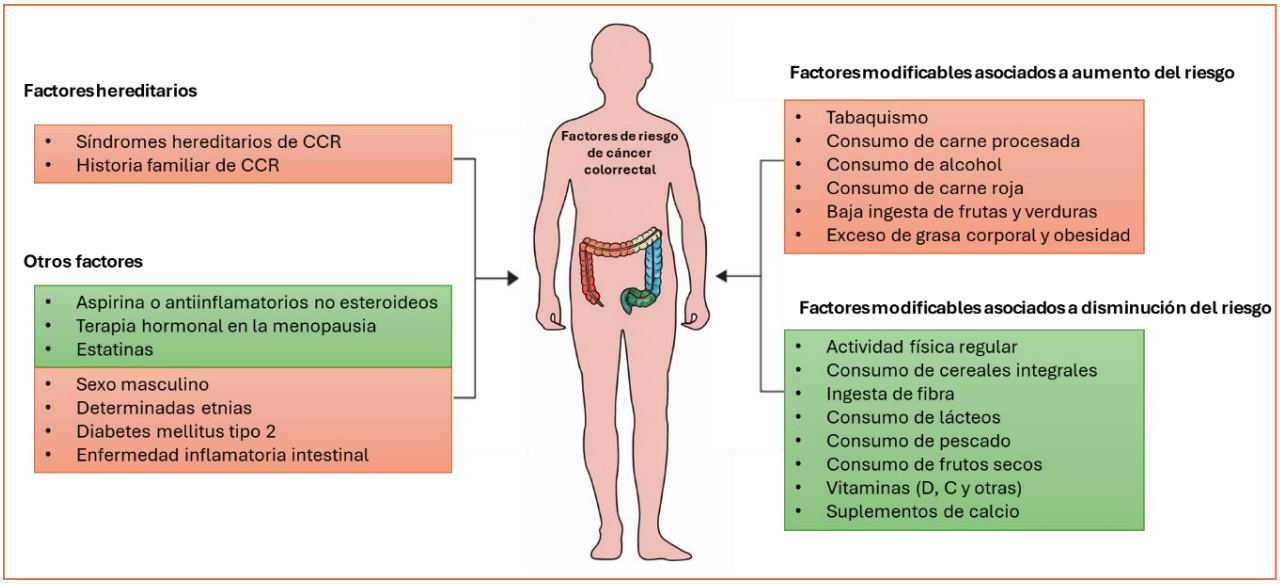


Figura 1. Principales factores de riesgo asociados al CCR. Adaptada de (23)

2. Fisiopatología del cáncer colorrectal

El CCR es el resultado de un proceso multifactorial y en múltiples etapas que implica la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas en el epitelio intestinal, junto con cambios en el microambiente tisular que favorecen la transformación maligna, la invasión y la diseminación tumoral. Desde el punto de vista fisiopatológico, el CCR no constituye una entidad homogénea, sino un conjunto de neoplasias con mecanismos de origen y progresión diversos, que convergen en un fenotipo maligno común.

2.1. Homeostasis del epitelio colorrectal

El epitelio colorrectal se caracteriza por una elevada tasa de renovación celular, organizada en unidades funcionales o criptas, en las que existe un equilibrio dinámico entre proliferación, diferenciación y apoptosis, esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular (24). Este

proceso de recambio continuo está sustentado por la actividad de las células madre intestinales localizadas en la base de la cripta, responsables de generar las distintas poblaciones celulares diferenciadas del epitelio colónico y de preservar la integridad funcional del tejido a lo largo del tiempo (24–26).

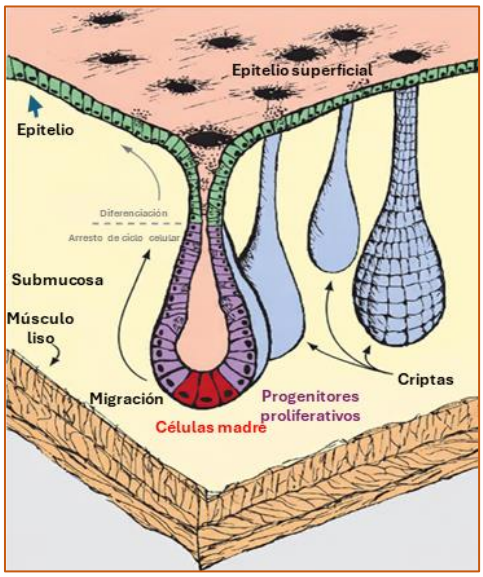


Figura 2. Organización del epitelio colónico y dinámica celular en las criptas intestinales. Adaptada de (26)

La regulación de esta homeostasis epitelial depende de la activación coordinada de múltiples vías de señalización altamente conservadas, que actúan de forma integrada para controlar la identidad celular, el destino proliferativo y la organización espacial del epitelio. Entre ellas, la vía Wnt desempeña un papel central en el mantenimiento del compartimento de células madre y en el control del balance entre proliferación celular y diferenciación terminal (27). En condiciones fisiológicas, la señalización Wnt se encuentra estrictamente regulada y permite la renovación ordenada del epitelio intestinal, en interacción con otras vías como Notch, BMP/TGF-β y EGFR, que modulan la diferenciación, la polaridad celular y la restricción del nicho proliferativo (26).

La activación aberrante de la vía Wnt constituye uno de los eventos más tempranos y frecuentes en la carcinogénesis colorrectal, y se considera un mecanismo iniciador común tanto en el CCR esporádico como en las formas hereditarias (28). La pérdida de función del gen *APC*, ya sea por mutaciones somáticas o germinales, conduce a la estabilización y acumulación nuclear de β-catenina, con la consiguiente activación constitutiva de la transcripción mediada por el complejo β-catenina/Tcf-4. Este complejo actúa como un regulador molecular clave de la decisión entre proliferación y diferenciación en las células epiteliales de la cripta (29–31).

La activación sostenida de esta vía altera de forma profunda los mecanismos de control del ciclo celular, e impiden la detención en fase G1, bloqueando la diferenciación terminal e induciendo resistencia a la apoptosis. Estos cambios favorecen la supervivencia y expansión clonal de células epiteliales con capacidad de autorrenovación, que adquieren una ventaja selectiva dentro del nicho de la cripta (32).

2.2. Secuencia adenoma–carcinoma y progresión tumoral

El desarrollo del CCR sigue, en la mayoría de los casos, una progresión conocida como secuencia adenoma–carcinoma, que consiste en la transformación gradual del epitelio colónico normal en carcinoma invasivo a través de lesiones precursoras benignas. La secuencia adenoma–carcinoma describe el proceso por el que el epitelio colónico normal progresa hacia carcinoma invasivo a través de la formación y evolución de pólipos adenomatosos. Los adenomas se originan cuando se alteran los mecanismos fisiológicos que regulan la renovación del epitelio intestinal y, a medida que éstos aumentan de tamaño y grado de displasia, se incrementa su potencial de transformación maligna. La progresión hacia carcinoma invasivo se acompaña de una desorganización de la arquitectura glandular, invasión de la lámina propia y, finalmente, penetración más allá de la *muscularis mucosae*.

Este modelo, propuesto inicialmente a partir de estudios histopatológicos y moleculares, refleja la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que confieren ventajas selectivas a las células neoplásicas (33). Entre los eventos iniciales más relevantes se encuentran las mutaciones en el gen supresor tumoral *APC*, que favorecen el desarrollo de adenomas convencionales, y las mutaciones activadoras en *BRAF*, asociadas al desarrollo de pólipos serrados. A partir de estas alteraciones iniciales, la progresión hacia lesiones de mayor grado de displasia y posteriormente hacia carcinoma invasivo requiere la adquisición de mutaciones adicionales en un orden especifico, por lo que solo una proporción de adenomas progresa a cáncer (34). Las alteraciones epigenéticas están involucrades en todas las fases de la secuencia adenoma-carcinoma, participando en la iniciación, progresión y metástasis del CCR (35).

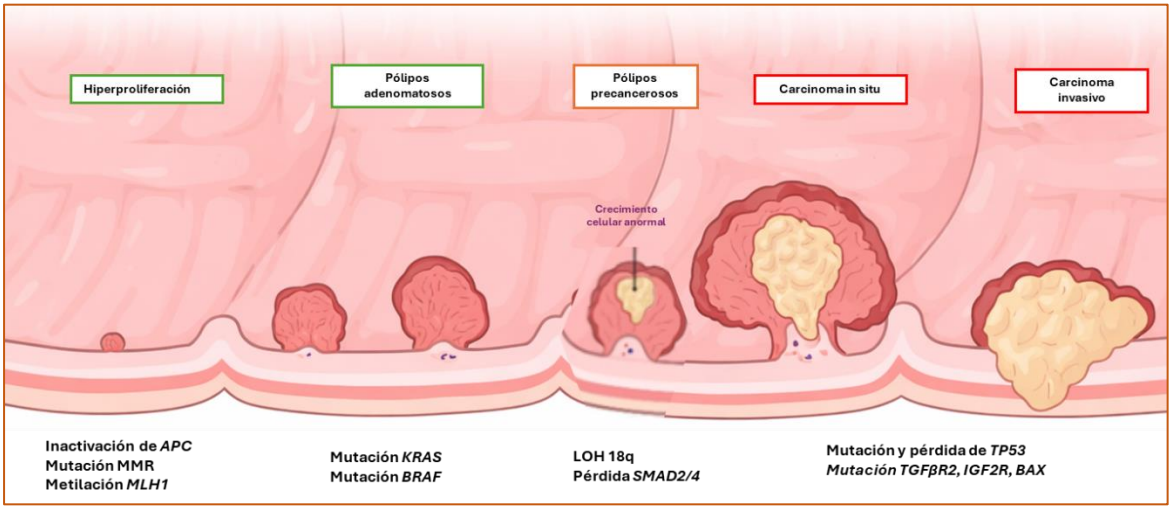


Figura 3. Secuencia adenoma-carcinoma en el CCR. Representación esquemática de la progresión desde epitelio colónico normal hasta carcinoma invasivo. MMR, DNA mismatch repair; LOH, loss of heterozygosity. Modificada de (36)

La duración de este proceso depende de la vía de tumorogénesis implicada. El desarrollo tumoral a través de la vía de inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *chromosomal instability*) puede prolongarse durante una década o más, a diferencia de los tumores asociados a inestabilidad de

microsatélites (MSI, del inglés *microsatellite instability*), que pueden desarrollarse en un intervalo temporal considerablemente más corto, de apenas unos años (34).

2.3. Bases moleculares de la carcinogénesis colorrectal

Desde el punto de vista molecular, la inactivación temprana del gen *APC* representa el evento iniciador más frecuente y conduce a la activación aberrante de la vía Wnt, que favorece la formación de adenomas iniciales (27,29). Posteriormente, la activación de oncogenes como *KRAS*, la pérdida de función de genes supresores tumorales como *TP53* y genes localizados en el cromosoma 18q (*SMAD2, SMAD4, DCC*) permite la transición hacia un fenotipo invasivo y maligno (37–40).

Aunque la secuencia adenoma–carcinoma explica la mayoría de los CCR, no todos los tumores siguen este modelo clásico. Se han descrito tres grandes vías que conducen al desarrollo del CCR, que son responsables de su heterogeneidad genética, epigenética e histológica: la vía CIN, la vía de la deficiencia en la reparación de errores de apareamiento del ADN (MMR, del inglés *DNA mismatch repair*) y la vía serrada (34).

La CIN es la más frecuente y está implicada en el 65-70 % de los CCR. Se observa tanto en la poliposis adenomatosa familiar como en la mayoría de los tumores esporádicos, y se caracteriza por aneuploidía, pérdidas de heterocigosidad y amplios reordenamientos cromosómicos (34,41). La mutaciones en *APC* aparecen como un evento genético temprano en la tumorogénesis colorrectal (29,33), y la pérdida de su actividad da lugar a la traslocación nuclear de beta-catenina y la activación de la ruta de señalización de Wnt (34). A estos eventos tempranos les siguen otras alteraciones moleculares, entre las que destacan las mutaciones activadoras en *KRAS*, presentes en aproximadamente el 40% de los CCR (42), y la inactivación del gen supresor tumoral *TP53*, que aparece en cerca del 60% de los tumores asociados a la vía CIN (43).

La vía de la MMR se asocia a MSI. Este mecanismo es característico del síndrome de Lynch y de aproximadamente un 10–15 % de los CCR esporádicos (44). En el contexto hereditario, se debe a mutaciones germinales en genes del sistema MMR, frecuentemente en los genes *MLH1* o *MSH2*, que conducen a la disfunción de las enzimas reparadoras y a la acumulación progresiva de errores de replicación en el genoma. La consecuencia molecular es la aparición de inestabilidad de microsatélites, que configuran el fenotipo de MSI de alto grado. En los casos esporádicos, la pérdida de función del sistema MMR suele deberse a la hipermetilación del promotor de *MLH1*, que provoca su silenciamiento transcripcional y la consiguiente inactivación del sistema de reparación (45).

La vía del fenotipo hipermetilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG island methylator phenotype*) constituye una ruta alternativa de carcinogénesis caracterizada por alteraciones epigenéticas extensas. En estos tumores se observa una elevada frecuencia de hipermetilación en regiones promotoras ricas en CpG, lo que conduce al silenciamiento transcripcional de genes implicados en la regulación del crecimiento celular y en la reparación del ADN. Cuando este fenómeno afecta al promotor de genes del sistema MMR, especialmente *MLH1*, puede producirse una inactivación funcional del sistema de reparación y la consiguiente aparición de inestabilidad de microsatélites (46). Los carcinomas colorrectales con alta frecuencia de metilación en múltiples islas CpG se denominan tumores CIMP positivos (45). Desde el punto de vista molecular, estos tumores se asocian con frecuencia a mutaciones activadoras en *BRAF*, especialmente la variante V600E, y rara vez coexisten con mutaciones en *KRAS* (47,48). Este perfil molecular es característico de la vía serrada de carcinogénesis, de modo que los tumores esporádicos con MSI de alto grado y mutación en *BRAF* se consideran derivados de lesiones precursoras serradas (49).

Más allá de las vías clásicas de carcinogénesis basadas en alteraciones genómicas, el análisis transcriptómico global ha permitido identificar diferentes programas biológicos en el CCR. El

Colorectal Cancer Subtyping Consortium definió en 2015 cuatro subtipos moleculares consensuados (Consensus Molecular Subtypes, CMS1–CMS4) que reflejan distintos contextos biológicos del tumor y del microambiente tumoral (50). La integración de las vías clásicas de carcinogénesis colorrectal con los subtipos moleculares transcriptómicos permite comprender mejor la heterogeneidad biológica del tumor. Esta relación conceptual entre las vías CIN, MSI y serrada y los subtipos CMS1–CMS4 se ilustra de forma esquemática en la Figura 4.

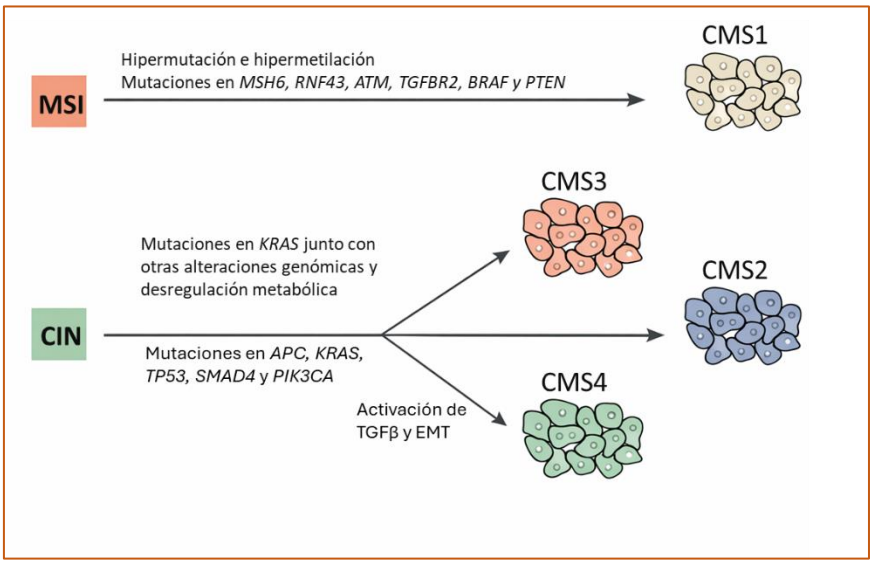


Figura 4. Carcinogénesis colorrectal y subtipos moleculares. Esquema de las potenciales rutas de progresión adenoma–carcinoma en el CCR y su relación con los subtipos moleculares consensuados (CMS). EMT, transición epitelio-mesénquima. Adaptado de (51)

El subtipo CMS1, denominado *MSI immune*, se caracteriza por una elevada carga mutacional, frecuente inestabilidad de microsatélites, hipermetilación de islas CpG, mutaciones en *BRAF* y una intensa infiltración inmunitaria. El subtipo CMS2, o *canonical*, representa el grupo más frecuente y se asocia típicamente a tumores con inestabilidad cromosómica y activación de las vías de señalización Wnt y MYC. El subtipo CMS3, denominado *metabolic*, presenta alteraciones en el metabolismo tumoral y mutaciones frecuentes en *KRAS*. Por último, el subtipo CMS4, o

mesenchymal, se caracteriza por una marcada activación de procesos relacionados con la transición epitelio-mesénquima, señalización TGF-β, angiogénesis y una fuerte interacción con el estroma tumoral, que se asocia generalmente a un peor pronóstico clínico (50,51).

2.3.1. El oncogén *RAS* en el cáncer colorrectal

Entre los oncogenes implicados en la carcinogénesis colorrectal, *RAS* constituye el más relevante por su elevada frecuencia de alteración y su impacto biológico y clínico. La familia *RAS* incluye las variantes *KRAS*, *NRAS* y *HRAS*, donde *KRAS* es la más frecuentemente mutada en el CCR. Las proteínas RAS regulan la transmisión de señales proliferativas desde la membrana celular hacia el núcleo a través de la vía de señalización *RAS–RAF–MEK–ERK* y las mutaciones activadoras en este gen inducen una activación constitutiva independiente de estímulos extracelulares y promueven una señal proliferativa continua.

Las mutaciones en *RAS* se detectan en aproximadamente el 40% de los CCR esporádicos y en una proporción similar de adenomas mayores de 1 cm, pero son infrecuentes en lesiones de menor tamaño (42,52,53), un patrón compatible con su adquisición durante la progresión adenomatosa (54). En el contexto metastásico, alrededor del 40–45 % de los tumores presentan mutaciones en *KRAS* o *NRAS*. Estas alteraciones se concentran principalmente en regiones concretas del gen, especialmente en el exón 2, afectando con mayor frecuencia a los codones 12 y 13 (55).

Desde el punto de vista clínico, la relevancia de las mutaciones en *RAS* es doble. Por un lado, su identificación en heces forma parte de estrategias de cribado no invasivas basadas en pruebas multidiana de ADN fecal (56). Por otro, en el CCR metastásico, la presencia de mutaciones activadoras en *KRAS* o *NRAS* se asocia a resistencia a terapias dirigidas contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), y es un biomarcador predictivo negativo fundamental para la selección del tratamiento sistémico (55). Así, la elevada frecuencia de mutaciones en *RAS* en CCR, su aparición en fases relativamente tempranas de la progresión tumoral y su

concentración en regiones génicas bien definidas han favorecido su incorporación como biomarcadores moleculares detectables mediante técnicas no invasivas.

2.3.2. Alteraciones epigenéticas en cáncer colorrectal

Además de las alteraciones genéticas clásicas, la carcinogénesis colorrectal está profundamente condicionada por modificaciones epigenéticas que alteran la expresión génica sin modificar la secuencia del ADN. Uno de los mecanismos mejor caracterizados es la hipermetilación del promotor de *MLH1*, que conduce al silenciamiento transcripcional del gen y a la consiguiente deficiencia del sistema MMR (57). Este fenómeno explica la mayoría de los tumores esporádicos con MSI de alto grado (MSI-H). Estas alteraciones se enmarcan dentro del denominado fenotipo CIMP comentado previamente que, desde el punto de vista molecular, se asocian frecuentemente a mutaciones activadoras en *BRAF* y desarrollo a partir de lesiones precursoras serradas (45,58).

Además de la hipermetilación focal en promotores específicos, el CCR puede presentar fenómenos más amplios de desregulación epigenética. Entre ellos destaca la hipometilación global del ADN, que puede asociarse a inestabilidad genómica y fenómenos de pérdida de impronta, que implica la pérdida de la expresión monoalélica dependiente del origen parental (59).

Desde un punto de vista biológico, diversos estudios han demostrado que el epitelio tumoral colorrectal presenta patrones de metilación del ADN distintos respecto al tejido colónico normal. Análisis genómicos integrativos han identificado regiones diferencialmente metiladas entre tumores colorrectales y mucosa colónica no neoplásica (43). Estos hallazgos muestran que las alteraciones epigenéticas forman parte del paisaje molecular característico del CCR y contribuyen a su heterogeneidad biológica.

Desde una perspectiva traslacional, la metilación aberrante del ADN ha despertado interés como fuente potencial de biomarcadores moleculares, especialmente por su aparición temprana en la carcinogénesis, su especificidad tumoral y su estabilidad biológica (60,61). Su relativa estabilidad química y la posibilidad de detectarla mediante métodos altamente sensibles han favorecido el desarrollo de aproximaciones diagnósticas basadas en la detección de ctDNA (62–65). La identificación de alteraciones de metilación específicas de tumor y su posterior detección en cfDNA constituyen la base de diversas estrategias de detección molecular no invasiva (60).

3. Diagnóstico y cribado del cáncer colorrectal

3.1. Presentación clínica

El CCR puede diagnosticarse a través de distintas vías clínicas, que reflejan tanto su evolución biológica como el contexto en el que se detecta. En la mayoría de los casos (entre el 70 % y el 90%) el diagnóstico se establece tras la aparición de signos o síntomas sugestivos (66,67). Estas manifestaciones clínicas suelen ser consecuencia del crecimiento tumoral hacia la luz intestinal o de la infiltración de estructuras adyacentes, por lo que con frecuencia el debut sintomático se asocia a estadios más avanzados de la enfermedad. Los síntomas más frecuentes incluyen rectorragia o melenas, dolor abdominal, anemia ferropénica de origen no explicado y cambios en el ritmo intestinal (67,68). En grandes cohortes clínicas, el cambio en el hábito intestinal constituye el síntoma más habitual, frecuentemente asociado a sangrado rectal, frente a formas de presentación menos comunes como la presencia de masa rectal o abdominal y la anemia ferropénica (69). En el contexto del CCR de inicio precoz (menores de 50 años), se ha descrito como sintomatología predominante la rectorragia, seguida de dolor abdominal y alteraciones del tránsito intestinal, junto con síntomas constitucionales como pérdida de peso o anemia (70). En fases avanzadas, la enfermedad puede debutar con síntomas derivados de complicaciones

locales o de diseminación metastásica, afectando principalmente a hígado, pulmón y peritoneo, con clínica asociada como dolor en hipocondrio derecho, distensión abdominal o saciedad precoz.

Por otro lado, hay una proporción de casos que se diagnostica en individuos asintomáticos (71,72), ya sea en el contexto de programas de cribado poblacional o como hallazgo incidental durante la realización de pruebas complementarias indicadas por otros motivos clínicos. Dado que las fases iniciales del CCR suelen cursar sin sintomatología específica, la detección precoz depende fundamentalmente de estrategias sistemáticas de cribado dirigidas a población de riesgo promedio o aumentado (73). Estas estrategias se tratarán más adelante en un apartado especifico.

3.2. Pruebas diagnósticas y estadiaje

El diagnóstico del CCR se establece mediante el análisis histológico del tejido, generalmente obtenido a través de biopsia endoscópica durante una exploración del tracto gastrointestinal inferior o mediante el análisis de una pieza quirúrgica.

La colonoscopia constituye la prueba diagnóstica de referencia, ya que permite la visualización directa de la mucosa del colon y recto, la localización precisa de la lesión y la toma de biopsias para confirmación histológica. Además, la colonoscopia tiene un papel tanto diagnóstico como terapéutico, ya que posibilita la resección endoscópica de pólipos y lesiones superficiales. La sensibilidad para la detección de CCR se encuentra sobre el 95% y varía según la experiencia de quien la practica y la localización del tumor (74,75).

Aunque la colonoscopia se considera un procedimiento seguro, no está exenta de complicaciones. La incidencia de eventos adversos graves se sitúa aproximadamente en 2,8 por cada 1000 exploraciones (76). En grandes metaanálisis internacionales que incluyen millones de

procedimientos, se ha descrito una tasa de hemorragia postprocedimiento de entre 1,8–2,6 por 1000 colonoscopias, perforación en torno a 0,5 por 1000, lesión esplénica en 0,06 por 1000 y una mortalidad asociada entre el 0,02-0,03 por cada 1000 exploraciones (77,78).

En aquellos casos en los que la colonoscopia completa no es factible, que puede ocurrir en el caso de una obstrucción tumoral o por dificultades técnicas, puede recurrirse a la colonografía por tomografía computarizada. Esta técnica permite realizar una evaluación radiológica del colon y la identificación de lesiones sugestivas de malignidad, pero no la obtención de muestras histológicas o la resección de lesiones.

Tras establecer el diagnóstico histológico de CCR, resulta imprescindible determinar la extensión locorregional y sistémica de la enfermedad. La estadificación del CCR constituye un proceso que combina criterios anatómicos, clínicos y biológicos que permiten estratificar el riesgo de recurrencia y orientar de forma individualizada el manejo terapéutico. El proceso de estadificación más aceptado es el sistema Tumor, Node, Metastasis (TNM) de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC) (79), que clasifica la enfermedad según la profundidad de invasión tumoral en la pared intestinal y estructuras adyacentes (T), la afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). La estadificación clínica (cTNM) se basa en los hallazgos obtenidos mediante exploración física y pruebas de imagen previas al tratamiento. Por su parte, la estadificación patológica (pTNM) requiere el análisis histológico de la pieza quirúrgica tras resección tumoral.

Además del sistema TNM, existen otros factores clínico-patológicos con relevancia pronóstica y que influyen de manera significativa en la toma de decisiones terapéuticas. Entre ellos se incluyen los valores preoperatorios de antígeno carcinoembrionario (CEA), la presencia de invasión linfovascular y perineural, el estado del margen circunferencial de resección, el grado de regresión tumoral tras tratamiento neoadyuvante y determinados marcadores moleculares, como son la MSI o la deficiencia del sistema MMR (80,81).

3.3. Cribado del cáncer colorrectal

El cribado de CCR constituye una intervención preventiva dirigida a individuos asintomáticos, orientada a la detección precoz de neoplasias colorrectales, así como de lesiones precursoras susceptibles de resección, con el objetivo de reducir la incidencia y la mortalidad asociadas. La justificación del cribado se basa en que la mayoría de los tumores se originan a partir de pólipos adenomatosos o lesiones serradas que progresan lentamente hacia carcinoma invasivo, lo que ofrece una amplia ventana de oportunidad para la detección e intervención tempranas (73,82).

La mayoría de los programas de cribado poblacional están dirigidos a individuos asintomáticos de riesgo promedio. En cambio, aquellos con antecedentes personales de CCR o pólipos avanzados, historia familiar significativa, síndromes hereditarios o enfermedades inflamatorias intestinales, requieren protocolos de vigilancia específicos (83–85). En la población de riesgo promedio, la edad es el principal determinante del inicio del cribado, aunque la edad de inicio y finalización del cribado difiere entre guías internacionales. En la actualidad, varias sociedades científicas estadounidenses recomiendan iniciar el cribado en adultos de riesgo promedio a partir de los 45 años, en respuesta al incremento observado en la incidencia de CCR en individuos más jóvenes. De forma general, el cribado se recomienda hasta los 75 años en población con esperanza de vida superior a 10 años, individualizándose la decisión entre los 76 y 85 años en función del estado funcional, comorbilidades, historia previa de cribado y preferencias del paciente (86).

La selección del test de cribado y su frecuencia constituyen elementos centrales en el diseño de los programas. Las estrategias más ampliamente utilizadas incluyen la colonoscopia o el test inmunoquímico fecal (FIT), aunque existen otras alternativas como el test multidiana de ADN en heces, la colonografía por TC o la sigmoidoscopia. La elección entre estas opciones depende de la evidencia disponible sobre su efectividad, precisión diagnóstica, coste, disponibilidad de recursos y, de manera muy importante, la adherencia de la población (87).

La utilización de la colonoscopia como herramienta primaria de cribado ha sido ampliamente utilizada en EEUU, a diferencia de otros paises donde se emplean habitualmente pruebas no invasivas como estrategia inicial. En individuos de riesgo promedio, la colonoscopia se recomienda cada 10 años, siempre que el examen sea completo y de calidad adecuada. Diversos estudios poblacionales han demostrado que una colonoscopia negativa se asocia a una reducción del riesgo de CCR y de mortalidad, que puede extenderse más allá de la década posterior al procedimiento (88–91). No obstante, se trata de una técnica invasiva que no está exenta de complicaciones, como hemorragia o perforación, y que requiere preparación intestinal, sedación y recursos especializados (92), lo que limita su aceptabilidad y su aplicabilidad universal como estrategia poblacional.

La mayoría de los programas organizados de cribado en Europa y otros contextos sanitarios se estructuran en torno a una estrategia escalonada basada inicialmente en pruebas no invasivas, fundamentalmente el FIT, realizado con periodicidad anual o bianual (93,94). Este enfoque, que ha demostrado ser altamente coste-efectivo desde la perspectiva de salud pública, se basa en la invitación sistemática de la población diana y en la derivación selectiva a colonoscopia únicamente en caso de resultado positivo. En este modelo, la colonoscopia actúa como prueba confirmatoria para establecer el diagnóstico definitivo y permitir la resección de lesiones premalignas, como AA y lesiones serradas sésiles. Los individuos en quienes se identifican estas lesiones deben incorporarse posteriormente a un programa de vigilancia endoscópica periódica, cuya frecuencia depende del número, tamaño, características histológicas y grado de displasia de las lesiones detectadas (84).

En España, el programa poblacional de cribado de CCR forma parte de la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud desde 2014 (95). La estrategia se basa en la determinación de sangre oculta en heces en población de riesgo promedio mediante FIT, con periodicidad bianual. La población diana incluye de forma universal a mujeres y hombres de 50

a 69 años, con ampliación progresiva hasta los 74 años en varias comunidades autónomas (96,97). Desde el punto de vista organizativo, la captación se realiza fundamentalmente mediante invitación activa a la población diana, con entrega del kit de recogida en el centro de salud o envío al domicilio del participante. Posteriormente, la muestra se devuelve en Atención Primaria o en oficinas de farmacia para su envio y análisis en laboratorios de referencia. Ante un resultado positivo, la colonoscopia constituye la prueba de confirmación diagnóstica y se lleva a cabo en el hospital de referencia, generalmente en un plazo de entre uno y dos meses (98).

4. Biomarcadores no invasivos para la detección y seguimiento del cáncer colorrectal

Los biomarcadores no invasivos para el CCR se fundamentan en la detección indirecta de la enfermedad mediante el análisis de sangre, heces u otros fluidos biológicos, sin requerir procedimientos endoscópicos. Estas pruebas permiten identificar diferentes manifestaciones de la biología tumoral, ya sea a través de la detección de sangrado microscópico en heces, de alteraciones genéticas o epigenéticas en células exfoliadas del epitelio intestinal, detección de ADN del tumor liberado al torrente circulatorio o mediante la combinación de varios de estos mecanismos (99). Desde un punto de vista funcional, pueden agruparse en tres grandes categorías: pruebas basadas en la detección de sangre oculta, pruebas moleculares en heces y pruebas sanguíneas basadas en cfDNA u otros marcadores séricos. Cada una de estas estrategias presenta un perfil diferenciado en términos de sensibilidad, especificidad, coste, complejidad técnica y aceptabilidad por parte de la población, factores que condicionan su utilidad clínica y su integración en los programas de cribado poblacional.

4.1. Pruebas basadas en sangre oculta en heces

Las pruebas de SOH constituyen uno de los pilares fundamentales del cribado poblacional del CCR y en la actualidad, representan la prueba de elección en numerosos sistemas sanitarios debido a su carácter no invasivo, su bajo coste y su adecuada aceptabilidad por parte de la población diana. El fundamento de estas pruebas radica en la detección de sangrado no visible procedentes de AA o carcinomas invasivos.

Las dos modalidades de pruebas de SOH incluyen el test basado en guayaco (gFOBT) y el FIT. El gFOBT ha sido utilizado históricamente en programas de cribado y se basa en una reacción química que detecta actividad peroxidasa asociada al grupo hemo de la hemoglobina. Sus principales limitaciones son la influencia de factores dietéticos y su carácter cualitativo, al no permitir establecer un punto de corte ajustable. El FIT emplea anticuerpos específicos frente a la hemoglobina humana, lo que mejora su especificidad y reduce los falsos positivos relacionados con la dieta. Además, los sistemas cuantitativos de FIT permiten ajustar el punto de corte de positividad en función de los recursos disponibles, especialmente del acceso a colonoscopia, y así optimitzar el equilibrio entre sensibilidad y especificidad en el cribado poblacional. Estas ventajas han llevado a que múltiples organizaciones sanitarias adopten la FIT como prueba preferente para el cribado del CCR, incluyendo las recomendaciones de la US Preventive Services Task Force (73).

La utilización del FIT como herramienta de cribado en programas poblacionales se ha asociado con una reducción significativa de la mortalidad por CCR (100,101) y tiene una eficacia similar a la colonoscopia en términos de detección de casos de CCR (102). En los programas de cribado poblacionales implementados por más de una década, se ha observado una reducción de la incidencia, especialmente de los tumores diagnosticados en estadios avanzados (101,103). La sensibilidad para la detección de CCR se sitúa entre el 65 y el 80 %, con una especificidad cercana al 94% (104–106). La sensibilidad y especificidad del FIT para la detección de AA son menores

que para el CCR, con una sensibilidad cercana al 25% y una especificidad entre el 68 y el 96 % (105–107). En relación con la colonoscopia y su impacto en la mortalidad por CCR a 10 años, el ensayo COLONPREV (ClinicalTrials.gov number, NCT00906997) ha demostrado que un programa de cribado basado en test inmunoquímico fecal bianual no es inferior a la colonoscopia única en términos de mortalidad específica por CCR (108).

A pesar de su sólida base de evidencia y su amplio uso, el FIT presenta limitaciones. Al basarse en la detección de hemoglobina fecal, su capacidad diagnóstica depende del sangrado de la lesión en el momento de la recogida de la muestra, lo que implica que lesiones con sangrado intermitente o ausente pueden no ser detectadas. Por otro lado, su sensibilidad es considerablemente menor para los AA que para el cáncer invasivo, de modo que su capacidad para identificar lesiones precursoras y su utilidad en estrategias orientadas a la prevención pueden verse limitadas. Estas limitaciones han impulsado la investigación y el desarrollo de nuevas estrategias no invasivas basadas en biomarcadores moleculares, con el objetivo de mejorar la detección precoz (73,99).

4.2. Test moleculares en heces

En los últimos años se han desarrollado estrategias moleculares que analizan directamente alteraciones genéticas y epigenéticas. Entre ellas se encuentra la prueba de ADN en heces multidiana (sDNA-FIT, del inglés *stool DNA–Fecal Immunochemical Test*), comercializada como Cologuard® (Exact Sciences). Este test fue aprobado para cribado de CCR en 2014 por la Food and Drug Administration (FDA) (109) y combina la detección de marcadores moleculares derivados de células tumorales desprendidas de pólipos adenomatosos avanzados y/o CCR hacia el lumen intestinal con la determinación simultánea de sangre oculta mediante FIT (110). Concretamente, el ensayo evalúa tres familias de biomarcadores: alteraciones de metilación aberrante en las regiones promotoras de *BMP3* y *NDRG4*, mutaciones en los codones 12 y 13

del gen *KRAS*, y hemoglobina fecal detectada por FIT. La sensibilidad obtenida de esta prueba en el ensayo Deep-C (ClinicalTrials.gov number, NCT01397747) para la detección de CCR y para lesiones precancerosas fue del 92,3% y del 42,4%, respectivamente, frente al 73,8 % y 23,8 % observado con FIT (110). La especificidad fue del 86,6 % para la prueba molecular y del 94,9 % para FIT.

La versión Cologuard Plus™ se ha optimizado con la ampliación a nuevos marcadores epigenéticos (*LASS4, LRRC4, PPP2R5C* y *ZDHHC1*) y se aprobó por FDA en enero de 2025. Esta prueba mostró en el estudio clínico BLUE-C (ClinicalTrials.gov number, NCT04144738) una mayor sensibilidad para la detección de CCR que el FIT aislado (93,9 % frente a 67,3%), así como una superior capacidad para identificar AA (43,4 % frente a 23,3 % con FIT) (105). Sin embargo, la especificidad fue del 90,6% para Cologuard Plus, frente al 94,8% del FIT para hallazgos no neoplásicos.

La prueba Colosense (Geneoscopy, Inc.) es una prueba multidiana basada en ARN fecal (mt-sRNA, del inglés multitarget stool RNA) que analiza ocho transcritos de ARN e incorpora detección de sangre oculta por FIT. El rendimiento se evaluó en el ensayo clínico de fase 3 CRC-PREVENT (ClinicalTrials.gov: NCT04739722) y mostró una sensibilidad del 94,4% para la detección de CCR y del 45,9% para AA. En el mismo estudio, la sensibilidad del FIT fue de 77,8% para la detección de CCR y del 28,9% para AA. La especificidad fue del 88,9% para Colosense y del 95,7% para FIT (106).

La estrategia de implementación recomendada para estas pruebas contempla una periodicidad de realización cada tres años, lo que representa una ventaja organizativa frente al FIT, cuya frecuencia habitual en los programas de cribado es anual o bianual. Sin embargo, esta mayor sensibilidad diagnóstica suele acompañarse de una especificidad ligeramente inferior en comparación con el FIT, lo que puede traducirse en un mayor número de colonoscopias indicadas tras resultados positivos. Estos avances reflejan una transición hacia estategias fecales

con mayor capacidad para detectar CCR o lesiones avanzadas, aunque la incorporación sistemática en programas poblacionales requiere un análisis cuidadoso del equilibrio entre rendimiento diagnóstico, coste-efectividad y el impacto que el aumento de colonoscopias derivadas puede tener sobre los recursos sanitarios disponibles (99).

4.3. Biomarcadores en sangre basados en ADN libre circulante y otros marcadores séricos

La eficacia de los programas de CCR depende en gran medida de la disponibilidad de pruebas que combinen alta sensibilidad para lesiones clínicamente relevantes, aceptabilidad por parte de la población y viabilidad a gran escala. Estas pruebas resultan especialmente atractivas por su carácter mínimamente invasivo, la ausencia de preparación intestinal o manipulación de heces y la posibilidad de integrarse con analíticas rutinarias en una única visita. Estas características podrían mejorar la adherencia, un factor determinante en la efectividad real de cualquier programa de cribado (111,112).

4.3.1. ADN libre circulante y ADN tumoral circulante

El ADN libre circulante (cfDNA, del inglés *cell-free DNA*) está constituido por pequeños fragmentos de ADN nuclear y mitocondrial extracelular presentes en la circulación sanguínea y otros fluidos biológicos (113). En individuos sanos, la mayor parte del cfDNA procede de células hematopoyéticas (114) y está formado principalmente por fragmentos de doble cadena, con un tamaño predominante cercano a 166 pares de bases, correspondiente a ADN asociado a nucleosomas (113,115,116). En pacientes con cáncer, una fracción del cfDNA puede derivar de células tumorales que se denomina ADN tumoral circulante (ctDNA, del inglés *circulating tumor DNA*), que presenta un tamaño menor (alrededor de 147 pares de bases) y suele estar más fragmentado que el resto del cfDNA (117,118).

La liberación de ctDNA a la circulación puede producirse mediante diferentes mecanismos biológicos. Entre ellos se incluyen mecanismos pasivos, principalmente apoptosis y necrosis, así como procesos de secreción activa, incluida la liberación de ADN asociado a vesículas extracelulares (119). El tamaño y los patrones de fragmentación del cfDNA y ctDNA varían según su mecanismo de liberación y origen celular, y pueden aportar información sobre la procedencia de los fragmentos circulantes (119–121). De forma complementaria, los perfiles de metilación del ADN, por su especificidad de tipo celular y su alteración característica en cáncer, pueden contribuir a la identificación de señales tumorales y del tejido de origen (121,122).

La cantidad de ctDNA detectable en plasma depende del equilibrio entre su liberación y su eliminación de la circulación. El cfDNA presenta una vida media corta, estimada en menos de 2 horas (123), como consecuencia de la degradación enzimática por DNasas presentes en el torrente sanguíneo (124), la eliminación activa de nucleosomas y ADN mediante captación hepática (125) y la filtración por órganos como el riñón y los ganglios linfáticos (124,126).

Además de estos factores biológicos, las condiciones preanalíticas son críticas para preservar la calidad de la muestra y la fiabilidad del análisis, ya que condicionan la cantidad, integridad y composición del cfDNA recuperado (127,128). El tipo de muestra, el tubo de extracción, el tiempo hasta el procesamiento, las condiciones de transporte, la centrifugación, el volumen de plasma, el almacenamiento y el método de extracción pueden influir en la fracción de ctDNA disponible para el análisis. Por ello, se recomienda utilizar plasma frente a suero, procesar la sangre de forma temprana o emplear tubos con conservantes para la estabilización celular (129), separar el plasma mediante doble centrifugación, almacenar las muestras a −80 °C cuando se prevea un almacenamiento prolongado y evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación (130).

Respecto al estudio de biopsia del tejido tumoral, considerado el método de referencia para la caracterización molecular de los tumores sólidos, el análisis de cfDNA presenta ventajas

relevantes. La obtención de sangre periférica es un procedimiento mínimamente invasivo que puede realizarse en situaciones en las que la muestra tisular no está disponible, es insuficiente o resulta difícil de obtener (118). Además, permite realizar análisis seriados para monitorizar la evolución molecular del tumor y, al proceder potencialmente de diferentes localizaciones tumorales y subclones, puede ofrecer una visión más global de la heterogeneidad tumoral que una biopsia tisular localizada (131,132).

En este sentido, el análisis de cfDNA y ctDNA permite evaluar diferentes características tumorales. Aunque gran parte de los estudios se han centrado en la detección de alteraciones somáticas, como variantes de nucleótido único, inserciones y deleciones, variaciones en el número de copias o fusiones, en los últimos años han adquirido especial interés otras dimensiones moleculares del cfDNA (118). Entre ellas se incluyen los patrones de fragmentación (133,134), que pueden aportar información sobre el origen tisular de los fragmentos circulantes, y los perfiles de metilación del ADN, que pueden contribuir a la identificación de señales tumorales y del tejido de origen (118,122,135,136). Estas características sitúan al cfDNA como una fuente de biomarcadores no invasivos de especial interés para la detección de señales tumorales en plasma, especialmente mediante el análisis de alteraciones epigenéticas asociadas al CCR.

4.3.2. Biomarcadores en fase de desarrollo y relevancia traslacional

En el campo del cribado del CCR mediante biomarcadores sanguíneos basados en cfDNA, se han descrito múltiples aproximaciones que se encuentran en fases iniciales o intermedias de validación clínica, algunos de los cuales ya han sido comercializdas (137). La mayoría de estas estrategias han sido evaluadas en estudios caso-control o en cohortes clínicas seleccionadas, lo que permite estimar su capacidad discriminativa en condiciones controladas. No obstante, la validación de su utilidad en programas de cribado requiere su evaluación en estudios prospectivos realizados en poblaciones asintomáticas.

Gran parte de estos desarrollos se fundamenta en la detección de alteraciones epigenéticas, particularmente patrones aberrantes de metilación en regiones promotoras de genes implicados en la carcinogénesis colorrectal. Desde el punto de vista metodológico, muchas de estas estrategias se apoyan en tecnologías accesibles en los laboratorios de biologia molecular, como la PCR cuantitativa o la PCR digital (137). Estas plataformas presentan ventajas relevantes en términos de estandarización, tiempo de respuesta y requerimientos de infraestructura, especialmente cuando se comparan con aproximaciones basadas en secuenciación masiva. La posibilidad de desarrollar ensayos multilocus mediante técnicas de amplificación dirigida permite diseñar herramientas potencialmente escalables y adaptables en laboratorios de biología molecular (138,139).

Gran parte de los desarrollos en el ámbito de los biomarcadores epigenéticos en cfDNA se ha centrado en la detección de patrones aberrantes de metilación en regiones génicas específicas. En una primera aproximación, diversos estudios han evaluado la utilidad diagnóstica de marcadores individuales basados en metilación en cfDNA. Entre los más estudiados se encuentra el gen *SEPT9*, cuya metilación en plasma ha sido ampliamente estudiada en el contexto del CCR (140,141). En un estudio basado en ddPCR que incluyó 103 pacientes con CCR y 32 controles, este marcador mostró una capacidad discriminativa moderada, con un área bajo la curva (AUC) de 0,71, una sensibilidad cercana al 74% y una especificidad del 50% (142). En esta misma línea, se han descrito otros candidatos basados en la evaluación de regiones génicas individuales, incluyendo loci asociados a ARN no codificantes largos (lncRNA), como LINC00473, cuya metilación en cfDNA ha mostrado potencial valor diagnostico (136).

Una segunda estrategia se basa en la integración de múltiples biomarcadores epigenéticos en paneles combinados, con el objetivo de mejorar el rendimiento diagnóstico global. Bajo este enfoque, Barták et al. evaluaron un panel de cuatro marcadores de metilación (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* y *PRIMA1*) en cfDNA de plasma mediante PCR cuantitativa específica para ADN metilado

(MethyLight) tras conversión con bisulfito (143). El análisis combinado de los cuatro marcadores permitió discriminar pacientes con CCR frente a controles con una sensibilidad del 91,5% y una especificidad del 97,3%, mientras que la detección de adenomas alcanzó una sensibilidad del 89,2%. Estos resultados apoyan el potencial de los paneles epigenéticos multilocus como herramientas diagnósticas, aunque deben interpretarse con cautela al no estar evaluadas en estudios prospectivos de poblaciones asintomáticas.

Más recientemente, algunos desarrollos han buscado integrar múltiples marcadores epigenéticos en ensayos multiplex optimizados para su aplicación clínica. El ensayo ColonAiQ está basado en la detección de metilación aberrante en sangre de seis marcadores mediante PCR cuantitativa en un único ensayo múltiplex. Tras una fase inicial de selección de biomarcadores a partir de regiones diferencialmente metiladas (144), el ensayo fue evaluado en una cohorte de validación ciega de 507 muestras de plasma. En este análisis detectó el 86% de los casos de CCR y un 42% de las lesiones con tamaño mediano de 15 mm, con una especificidad del 92% en controles que presentaban una colonoscopia negativa (139).

Además de su potencial aplicación en el cribado poblacional, los biomarcadores epigenéticos circulantes se han evaluado en otros contextos clínicos del CCR, particularmente en el seguimiento tras tratamiento curativo y en la detección precoz de recidiva. En algunos de los estudios previamente mencionados, la cuantificación seriada de estos marcadores en plasma ha mostrado cambios dinámicos asociados a la evolución de la enfermedad. Por ejemplo, en el estudio basado en metilación de *SEPT9* por PCR digital, se observó una reducción significativa de los valores de ADN metilado tras la resección quirúrgica del tumor, lo que sugiere su posible utilidad para monitorizar la respuesta al tratamiento (139).

De forma similar, el ensayo ColonAiQ ha sido evaluado posteriormente en un estudio prospectivo longitudinal en pacientes con enfermedad localizada, donde un resultado positivo permitió identificar enfermedad mínima residual y estratificar el riesgo de recaída tras la cirugía,

con un *hazard ratio* de 17,5 en comparación con los pacientes con la prueba ColonAiQ negativa. Además, el seguimiento de los pacientes permitió detectar recurrencias con una mediana de anticipación de aproximadamente 3,3 meses respecto a la confirmación radiológica (139,145).

En una línea complementaria, Barault y colaboradores identificaron mediante análisis de metilación a escala genómica un panel de cinco loci hipermetilados (*EYA4, GRIA4, ITGA4, MAP3K14-AS1* y *MSC*) y desarrollaron ensayos cuantitativos basados en PCR digital para su detección en plasma (146). En una cohorte de pacientes con CCR metastásico, al menos uno de estos marcadores fue detectable en el 87 % de los casos, lo que permitió utilizar el panel como indicador universal de ctDNA. El análisis longitudinal mostró que las variaciones en los niveles de metilación en plasma se correlacionaban con la respuesta al tratamiento y con la progresión tumoral evaluada mediante técnicas de imagen.

Estos hallazgos ilustran que los biomarcadores circulantes basados en metilación podrían desempeñar un papel relevante en la monitorización de los pacientes, además de la aplicación en la detección precoz abordada en esta tesis.

4.3.3. Pruebas en sangre con validación poblacional en cribado

Algunas de las pruebas desarrolladas con finalidad de cribado de CCR han avanzado hasta fases de validación en estudios prospectivos en población de riesgo promedio. Es relevante resaltar que los Centers for Medicare & Medicaid Services en EEUU, han establecido que cubrirán una prueba sanguínea de cribado para CCR cada tres años siempre que alcance al menos un 74% de sensibilidad, un 90% de especificidad y se disponga de aprobación regulatoria por la FDA.

El primer ensayo basado en la detección de ADN que obtuvo aprobación por la FDA para el cribado del CCR fue el test Epi proColon®. El ensayo está diseñado para la detección de *SEPT9* metilada en plasma, una alteración epigenética característica del tejido tumoral que no se observa en la mucosa colónica normal. En términos de rendimiento diagnóstico, estudios realizados en cohortes seleccionadas por hallazgos colonoscópicos mostraron una sensibilidad

del 75% para la detección de CCR y una especificidad del 87% (147). Sin embargo, estudios prospectivos en población asintomática han comunicado sensibilidades en torno al 48 % para la detección de CCR y de un 11% para AA (141). La FDA aprobó en 2016 esta prueba como ayuda para la detección de CCR en individuos de riesgo promedio que rechazan métodos de cribado más sensibles recomendados por las guías clínicas.

En años los últimos años, han surgido pruebas basadas en aproximaciones multiómicas, que integran información procedente del cfDNA con otras señales biológicas, como firmas proteómicas o epigenéticas, combinadas mediante algoritmos de aprendizaje automático. Dos ensayos sanguíneos desarrollados para cribado de CCR han superado estudios prospectivos en población general de riesgo promedio: Shield® (Guardant) y PREEMPTCRC® (Freenome) (148).

La prueba Shield® fue aprobada por la FDA en julio de 2024 para el cribado en población a partir de los 45 años. En el ensayo ECLIPSE (ClinicalTrials.gov: NCT04136002), esta prueba ha obtenido una sensibilidad del 83% para la detección de CCR y una especificidad del 90 % en individuos sin con colonoscopia negativa o pólipos no adenomatosos (149). Sin embargo, la sensibilidad para AA fue del 13%, lo que pone de manifiesto una limitación relevante en la detección de lesiones precursoras.

De manera similar, el estudio PREEMPT (ClinicalTrials.gov: NCT04369053) ha evaluado el rendimiento de la prueba sanguínia PREEMPTCRC® de Freenome basada en una plataforma multiómica que analiza biomarcadores genómicos, epigenómicos y proteómicos para detectar señales específicas de cáncer, incluyendo cfDNA. En una cohorte prospectiva que evaluó 27000 participantes de entre 45 y 85 años con riesgo promedio de cáncer colorectal, el test mostró una sensibilidad del 79,2% para la detección de CCR y una especificidad del 91,5%. La sensibilidad para lesiones precancerosas avanzadas fue del 12,5% (150).

Los resultados de los estudios ECLIPSE y PREEMPT muestran que las pruebas sanguíneas basadas en biopsia líquida alcanzan niveles adecuados de sensibilidad y especificidad para CCR en

población de riesgo promedio, pero evidencian todavía una limitación importante en la identificación de AA.

Distintos grupos independientes han evaluado el impacto cínico y el coste-efectividad de estas estrategias en el contexto del cribado poblacional (151–153). A pesar de variaciones en los supuestos relativos a adherencia, sensibilidad para CCR y AA, intervalos de cribado y costes, los modelos coincidieronen que las estrategias consolidadas de FIT anual, test de ADN fecal multitarget cada tres años o colonoscopia cada diez años presentan un impacto mayor en la reducción de incidencia y mortalidad por CCR en comparación con una prueba sanguínea que cumpla únicamente los umbrales mínimos de sensibilidad y especificidad establecidos por los Centers for Medicare & Medicaid Services. Incluso con tasas de participación elevadas, una estrategia basada en pruebas sanguíneas cada tres años lograría prevenir menos casos y muertes por CCR que un programa de FIT anual con una participación moderada.

La mejora de la sensibilidad para AA podría incrementar la efectividad relativa de las pruebas no invasivas en plasma. Sin embargo, incluso asumiendo sensibilidades de hasta el 50% para estas lesiones, una estrategia trienal no alcanzaría la efectividad del FIT anual, siempre que se considere un rendimiento independiente en cada ronda de cribado (148).

Desde el punto de vista económico, los modelos de coste-efectividad sugieren que una prueba sanguínea con un coste aproximado de 500 dólares podría ser más coste-efectiva que la ausencia de cribado cuando se aplica un umbral de disposición a pagar de 100 000 dólares por año de vida ajustado por calidad (QALY, del inglés *quality-adjusted life year*) ganado. No obstante, en los escenarios analizados no superaría en coste-efectividad a las estrategias de cribado actualmente establecidas (148). Estos resultados sugieren que, con las características de rendimiento actuales, las pruebas sanguíneas podrían desempeñar un papel complementario en individuos que rechazan otras estrategias de cribado, pero no constituyen por el momento un sustituto de las modalidades consolidadas.

En conjunto, estos estudios reflejan el avance de las pruebas sanguíneas basadas en biopsia líquida para la detección del CCR, aunque también ponen de manifiesto sus limitaciones actuales para identificar lesiones precursoras avanzadas. La Tabla 1 resume estudios representativos de biomarcadores sanguíneos evaluados para la detección precoz del CCR.

Tabla 1. Rendimiento diagnóstico de biomarcadores basados en cfDNA para la detección precoz de CCR en estudios representativos

Estudio	Tipo de estudio	Tecnología	Marcadores moleculares	Población estudiada	Sensibilidad CCR	Sensibilidad AA	Especificidad
Church et al, 2014 (141)	Cribado poblacional	qPCR	Prueba Epi proColon: Metilación *SEPT9*	7941	48%	11%	92%
Chung et al., 2024 (149)	Cribado poblacional	NGS + fragmentómica	Prueba Shield: Metilación (múltiples genes) + fragmentómica	10258	83%	13%	90%
Shaukat et al., 2025 (150)	Cribado poblacional	NGS + proteómica	Prueba PREEMPTCRC: ctDNA (múltiples genes) + proteínas	48995	79,2%	12,5%	91,5%
Cai et al., 2021 (139)	Casos-control multicéntrico	qPCR	Prueba ColonAiQ: Panel metilación *(SEPT9, BCAN, BCAT1, IKZF1, VAV3)*	507	86%	42%	92%
Barták et al., 2017 (143)	Casos-control	qPCR	Panel metilación (*SFRP1, SFRP2, SDC2, PRIMA1)*	121	91,5%	89,2%	97,3%
Ma et al., 2021 (142)	Casos-control	ddPCR	Metilación *SEPT9*	135	74%	No evaluado	50%
Pan et al. (154)	Meta-análisis	qPCR/ddPCR /NGS	Metilación (múltiples genes)	147 estudios; >15,000 individuos	66%	No evaluable*	90%

** No evaluable debido a la elevada heterogeneidad entre los estudios incluidos en el metaanálisis*

4.3.4. Marcadores tumorales en suero

Los marcadores tumorales séricos constituyen herramientas ampliamente utilizadas en la práctica clínica para el manejo del CCR, especialmente en el ámbito del seguimiento y la evaluación pronóstica. Sin embargo, su papel en el diagnóstico precoz es limitado debido a su

insuficiente sensibilidad en estadios iniciales y a problemas de especificidad. A continuación, se describen los principales marcadores séricos empleados en este contexto.

4.3.4.1. Antígeno carcinoembrionario

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es el marcador tumoral sérico más ampliamente utilizado en el laboratorio clínico en el contexto de CCR. Se trata de una glicoproteína oncofetal sintetizada durante el desarrollo embrionario en el tracto digestivo y reexpresada en diversos tumores, especialmente del tracto gastrointestinal. Aunque su función biológica no está completamente definida, se ha relacionado con procesos de adhesión celular, respuesta inmune y progresión tumoral (155).

En el contexto clínico, el CEA puede encontrarse elevado en pacientes con CCR, así como en otros tumores y en diversas condiciones no neoplásicas, como en enfermedades inflamatorias y en individuos fumadores, lo que limita su especificidad. En relación con la detección precoz, múltiples estudios han demostrado que presenta una sensibilidad insuficiente, especialmente en estadios iniciales de la enfermedad. Un meta-análisis reporta una sensibilidad aproximada del 46% para el diagnóstico de CCR, con una especificidad cercana al 89% (156), valores que, junto con la baja prevalencia de la enfermedad en población asintomática, impiden su uso como herramienta de cribado (157) y su uso para este fin no está recomendado en guías de práctica clínica (158,159).

A pesar de sus limitaciones, el CEA puede tener utilidad como apoyo diagnóstico en casos con sospecha clínica o radiológica, así como en el ámbito pronóstico y en el seguimiento de pacientes tras el tratamiento. El punto de corte más utilizado es de 5 ng/mL, aunque estudios recientes sugieren valores inferiores, en torno a 3 ng/mL, como umbral óptimo, mostrando que niveles preoperatorios elevados se asocian de forma independiente con un peor pronóstico en términos de recurrencia y supervivencia en pacientes con CCR (160).

4.3.4.2. Antígeno carbohidrato 19.9

El antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9) es un marcador tumoral sérico ampliamente utilizado en tumores gastrointestinales, especialmente en el carcinoma pancreático. En el CCR, también puede encontrarse elevado, y su determinación conjunta con el CEA se ha propuesto con el objetivo de mejorar la sensibilidad diagnóstica.

No obstante, su utilidad en el cribado del CCR es muy baja debido a su sensibilidad, estimada en torno al 30% (159). Su principal valor clínico se encuentra en la monitorización de la enfermedad, ya que sus niveles se correlacionan con la carga tumoral y pueden reflejar la respuesta al tratamiento. Una elevación persistente o progresiva del CA 19.9 puede asociarse a progresión tumoral o a una respuesta terapéutica insuficiente, lo que lo convierte en un marcador complementario en el seguimiento de pacientes con CCR.

5. Estrategias secuenciales de cribado del cáncer colorrectal

El cribado poblacional de CCR basado en FIT constituye actualmente el modelo estándar en numerosos sistemas sanitarios, que ha demostrado reducir la incidencia y mortalidad asociadas al CCR mediante la detección precoz de neoplasias invasivas y lesiones precursoras avanzadas. No obstante, su implementación efectiva depende no solo del rendimiento diagnóstico del test inicial, sino también de la capacidad estructural del sistema sanitario para absorber el volumen de colonoscopias derivadas de los resultados positivos.

En la situación actual, caracterizado por tasas de participación en torno al 50% en múltiples programas (161), el número absoluto de colonoscopias indicadas tras un FIT positivo representa ya una carga asistencial considerable. Por tanto, el equilibrio entre sensibilidad diagnóstica y sostenibilidad estructural del programa adquiere un papel central en la planificación estratégica del cribado.

El rendimiento del FIT puede modularse mediante la modificación del punto de corte de concentración de hemoglobina fecal considerado positivo. La reducción de dicho umbral incrementa la sensibilidad para la detección de CCR y AA, pero a costa de una disminución de la especificidad que se traduce en un aumento sustancial del número de resultados positivos y, en consecuencia, de colonoscopias indicadas. Por tanto, un aumento de la participación de la población en el programa de cribado o una reducción del punto de corte del FIT podrían generar una presión asistencial difícilmente asumible y convertir a la colonoscopia como el principal factor limitante de las estrategias de prevención y diagnóstico precoz de CCR.

En este escenario, las estrategias secuenciales de cribado emergen como una alternativa potencialmente más eficiente, orientada a aumentar el valor predictivo positivo del algoritmo global y reducir el número de exploraciones innecesarias. Estas estrategias consistirían en la incorporación de una segunda prueba no invasiva tras un resultado positivo del FIT, con el objetivo de refinar la selección de individuos que realmente requieren una colonoscopia diagnóstica.

Un posible enfoque para optimizar la eficiencia del cribado consistiría en incorporar una prueba adicional tras un resultado positivo del FIT, de modo que la colonoscopia se reserve para los individuos con resultados positivos en ambas pruebas. Diversos estudios piloto han explorado estrategias de triage tras un resultado positivo en el FIT con el objetivo de reducir el número de colonoscopias indicadas, incluyendo el uso de biomarcadores adicionales fecales o sanguíneos (162,163). Algunos trabajos han planteado que la combinación de FIT con biomarcadores séricos puede mejorar la discriminación entre individuos con y sin CCR y reducir el número de colonoscopias innecesarias sin comprometer la detección de cáncer colorectal (164). De forma similar, estudios más recientes han desarrollado algoritmos que integran el valor cuantitativo del FIT con biomarcadores plasmáticos y variables clínicas para optimizar la asignación de colonoscopia en individuos con FIT positivo para reducir el número de colonoscopias necesarias

sin comprometer la detección de cáncer o AA (165). Sin embargo, estas aproximaciones permanecen en fase de investigación y requieren validación prospectiva en población asintomática antes de su eventual incorporación en los programas de cribado.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, las estrategias secuenciales de cribado representan una aproximación conceptualmente atractiva para optimizar la eficiencia estructural del programa poblacional de CCR, donde los biomarcadores sanguíneos basados en ctDNA, particularmente aquellos basados en alteraciones de metilación aberrante, podrían postularse como buenos candidatos como pruebas de segunda línea tras un resultado positivo de FIT, manteniendo al mismo tiempo la sostenibilidad del sistema.

En este marco se inscribe el presente proyecto, que inicialmente cuenta con una financiación limitada, y cuyo planteamiento parte de la necesidad de generar evidencia analítica mediante el desarrollo de un ensayo técnicamente sencillo, reproducible y potencialmente escalable en el laboratorio clínico. El objetivo no se limita a demostrar la asociación biológica de determinados biomarcadores con la enfermedad, sino a evaluar su comportamiento en condiciones metodológicas compatibles con la práctica asistencial real y establecer una base sólida que permita plantear estudios de validación clínica a mayor escala con una justificación científica y económica adecuada.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La detección precoz del CCR y de sus lesiones precursoras avanzadas constituye un elemento clave para mejorar el pronóstico y anticipar la intervención antes del desarrollo de enfermedad invasiva. Aunque los programas de cribado han demostrado utilidad en este ámbito, las estrategias actualmente disponibles presentan limitaciones relacionadas con la adherencia poblacional y con la sensibilidad para identificar lesiones preneoplásicas. Estas limitaciones justifican la búsqueda de métodos no invasivos alternativos que amplíen las posibilidades de diagnóstico temprano de CCR y de sus lesiones precursoras.

En este marco, el análisis de biomarcadores epigenéticos y genéticos asociados a la carcinogénesis colorrectal en cfDNA, mediante técnicas moleculares de alta sensibilidad, podría permitir la identificación de señales tumorales o preneoplásicas en sangre periférica. Por tanto, la hipótesis de esta Tesis Doctoral es que el análisis de cfDNA constituye una estrategia no invasiva con potencial utilidad para la detección precoz del CCR y de lesiones precursoras avanzadas.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es desarrollar estrategias basadas en el análisis de biomarcadores moleculares en cfDNA mediante ddPCR para la detección no invasiva del CCR y de lesiones precursoras avanzadas.

Los objetivos específicos son:

1. Desarrollar y optimizar un procedimiento de análisis de cfDNA basado en un panel de biomarcadores epigenéticos seleccionados para la detección de CCR y lesiones precursoras avanzadas mediante ddPCR.

2. Desarrollar un ensayo multiplex de ddPCR para la detección de mutaciones frecuentes de *KRAS* en cfDNA.
3. Evaluar el rendimiento diagnóstico de los métodos desarrollados, en términos de sensibilidad y especificidad, en un estudio clínico piloto para la detección de CCR y lesiones precursoras avanzadas.
4. Evaluar de forma exploratoria la relación entre los biomarcadores moleculares detectados en cfDNA y los resultados de pruebas no invasivas utilizadas en el contexto del CCR, incluyendo la sangre oculta en heces y los marcadores séricos CEA y CA 19-9.

Material y métodos

1. Diseño del estudio clínico

El presente trabajo corresponde a un estudio de pruebas diagnósticas con diseño caso-control, en el que se comparó el rendimiento de los biomarcadores moleculares en ctDNA para la detección de AA y CCR.

1.1. Población de estudio y clasificación clínica

La población del estudio estuvo constituida por individuos de 50 a 69 años con resultado positivo en el test de SOH del programa de cribado de CCR de Catalunya. La invitación a participar se realizó en el Servicio de Epidemiología Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España). Tras aceptar la participación y firmar los consentimientos informados, a cada paciente se le entregó un kit de recogida de heces que incluía un tubo colector con varilla y reactivo estabilizador, junto con las instrucciones del fabricante. Además, se informó del proceso que debería llevar a cabo para la correcta entrega de muestras necesarias para la participación en el estudio. Este procedimiento se resume en la figura 5.

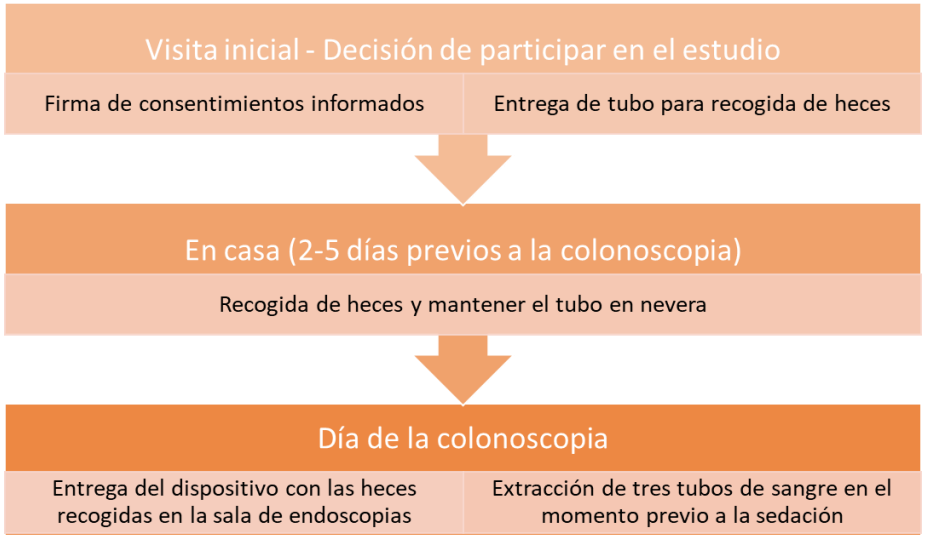


Figura 5. Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes procedentes del Programa de Cribado de CCR y recogida de muestras

Los criterios de inclusión en el estudio incluyeron que el paciente tuviera una colonoscopia programada en los dos meses posteriores a la firma del consentimiento informado, disponibilidad para proporcionar muestras biológicas antes de la prueba invasiva. También se exigió capacidad para comprender el estudio y firmar el consentimiento informado. Se excluyeron aquellos individuos con antecedentes personales de CCR o adenomas, los que hubieran participado en ensayos clínicos con medicación experimental en los dos meses previos y las embarazadas. El número de individuos reclutados fue de 52, pero dos de ellos no entraron en el estudio al no realizarse la extracción de sangre.

La colonoscopia con estudio histopatológico se utilizó como prueba de referencia (gold standard) para la clasificación de los individuos. En función de los hallazgos, los sujetos se agruparon en tres categorías diagnósticas: colonoscopia normal o pólipos no adenomatosos, adenomas u otras lesiones avanzadas, y CCR. Adicionalmente, para determinados análisis diagnósticos se definió la categoría de neoplasia avanzada (NA), que incluyó conjuntamente a los individuos con AA y CCR. Esta estratificación clínica está alineada con la estrategia de seguimiento recomendada en las guías nacionales y europeas:

- Grupo control: Los individuos con colonoscopia normal o con pólipos no adenomatosos fueron considerados de bajo riesgo. En este grupo se incluyen los individuos con pólipos hiperplásicos distales menores de 10 mm o hasta cuatro pólipos no avanzados de menos de 10 mm (adenomas tubulares sin displasia de alto grado ni componente velloso) que no requieren una vigilancia específica. A estos individuos se le ofrece retornar al programa poblacional de cribado mediante test de sangre oculta en heces o bien a una colonoscopia a los diez años.
- Grupo AA: Se incluyeron los individuos que presentan lesiones de mayor riesgo y que requieren vigilancia con colonoscopia programada al año (vigilancia intensiva) o a los tres años (vigilancia estándar). Se seleccionaron para este grupo los individuos con

presencia de AA (tamaño mayor o igual a 10 mm, componente velloso o displasia de alto grado), lesiones serradas avanzadas (mayores o iguales de 10 mm o con displasia) o presencia de más de cuatro pólipos adenomatosos y/o serrados.

- Grupo CCR: Se incluyeron los individuos diagnosticados de CCR en cualquiera de los estadios. La estadificación de los individuos con CCR se llevó a cabo siguiendo la clasificación internacional TNM (Tumor, Node, Metastasis), en su octava edición publicada por la Union for International Cancer Control (166) y la American Joint Committee on Cancer (AJCC) (79). El sistema establece el estadio tumoral en función de la profundidad de invasión de la pared intestinal (T), la afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). La combinación de estos tres parámetros permitió clasificar a cada paciente en los estadios I a IV.

Además de los individuos procedentes del programa poblacional de cribado de CCR, el protocolo del estudio clínico se amplió para incluir una cohorte adicional de individuos con diagnóstico confirmado de CCR, independientemente de la edad.

Estos individuos fueron reclutados en la Consulta de Diagnóstico y Tratamiento Rápido (PDTR) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. La incorporación de estos individuos al estudio y la firma del consentimiento informado se realizaron tras la primera visita médica posterior a la colonoscopia diagnóstica, una vez confirmado el diagnóstico de CCR. En esta cohorte de individuos no se recogieron muestras de heces, dado que los individuos acudían tras la colonoscopia diagnóstica y un test de sangre oculta positivo podría ser consecuencia del procedimiento endoscópico.

1.2. Obtención y manejo de muestras

Las muestras de sangre de los individuos que procedían del Programa de Cribado de CCR de Catalunya se obtuvieron en la sala de endoscopias inmediatamente antes de la colonoscopia, en el mismo momento de la colocación de la vía para el suministro de la sedación con propofol. Se extrajeron un total de dos tubos de sangre total para el estudio de cfDNA en plasma y un tubo de suero para la determinación de CEA.

En la cohorte de individuos reclutados en la consulta de PDTR, la extracción se llevó a cabo en el Servicio de Extracciones el mismo día o los días posteriores a la primera consulta, siempre antes del inicio del tratamiento neoadyuvante y/o la cirugía de resección del tumor primario. De esta forma, se garantizó la obtención de muestras plasmáticas en un contexto preoperatorio, con el objetivo de asegurar la comparabilidad con la cohorte inicial de cribado.

Para el estudio de cfDNA en plasma se seleccionaron los tubos Cell-Free DNA Collection Tube (Roche, ref. 07785666001), con capacidad de 8,5 mL, específicamente diseñados para la recogida y estabilización de cfDNA en sangre periférica. Estos tubos contienen K_3EDTA como anticoagulante y un preservante celular que evita la lisis de leucocitos para garantizar la preservación del cfDNA 7 días (167). Tras la extracción, las muestras se homogeneizaron mediante 8–10 inversiones suaves y se mantuvieron a temperatura ambiente (18–25 °C) hasta su centrifugación en el laboratorio a 1600 × g durante 10 minutos. El plasma obtenido tras la centrifugación se conservó a -80ºC y se sometió a una centrifugación adicional a 4500 x g durante 10 minutos el día de la extracción del cfDNA.

Los tubos BD Vacutainer® SST™ para suero con gel separador se utilizaron para la medición de CEA, que se analizaron de manera inmediata tras su llegada al laboratorio de Bioquímica. Posteriormente, el suero sobrante se conservó a -80ºC.

La recogida de la muestra fecal fue realizada directamente por el paciente en su domicilio en los días previos a la colonoscopia con el kit FOB MonlabTest® (Monlab, Barcelona, España). La

muestra se entregó el mismo día de la colonoscopia en el Servicio de Patología Digestiva y se envió al laboratorio para su análisis.

1.3. Extracción de ADN libre circulante a partir de plasma

La extracción del cfDNA se realizó empleando el kit MAGicBead™ cfDNA Isolation Kit (Zymo Research), diseñado específicamente para la purificación de cfDNA a partir de plasma humano (168). Este sistema se basa en una química de unión al ADN a través de esferas magnéticas, que permite una recuperación adecuada de fragmentos de bajo peso molecular, característicos del cfDNA.

El cfDNA se extrajo a partir de entre 3 y 4 mL de plasma siguiendo las proporciones recomendadas por el fabricante. De manera resumida, el procedimiento incluye una etapa inicial de lisis y unión del cfDNA a las esferas magnéticas, seguida de lavados sucesivos que eliminan proteínas y contaminantes plasmáticos. Por último, el ADN se recupera mediante elución en 25 µL de tampón libre de nucleasas. El cfDNA purificado se cuantifica y se almacena a –80 °C hasta su análisis.

Para el análisis de mutaciones en *KRAS*, las condiciones de extracción del cfDNA se adaptaron específicamente a volúmenes reducidos de muestra, empleando 1 mL de plasma como volumen inicial y realizando la elución final en 15 µL de tampón de elución.

1.4. Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN extraído se realizó utilizando el Qubit dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante (169). Para cada determinación se mezclaron 2 µL de ADN purificado con 198 µL del reactivo de trabajo, y tras 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la fluorescencia se midió en el fluorómetro

Qubit™ 2.0. La concentración de ADN obtenida se expresó en ng/µL y se empleó para evaluar el rendimiento de la extracción del cfDNA.

Las muestras que presentaban una concentración inferior a 0.5 ng/µL no se consideraron adecuadas para seguir el proceso a la siguiente fase y requirió una nueva obtención de muestra.

1.5. Selección de marcadores epigenéticos

La selección de regiones a analizar se basó en resultados previamente publicados por otros grupos (139,142,143,146) y fue posteriormente adaptado para este estudio.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de los *loci* seleccionados en otras cohortes independientes y contextualizar los biomarcadores analizados en este estudio, se realizó una revisión de los niveles de metilación correspondientes a las posiciones CpG de interés en muestras de adenocarcinoma colorrectal y tejido colónico normal procedentes del proyecto TCGA (43). Para ello se utilizaron los valores de metilación (β-values) generados mediante arrays Illumina HumanMethylation450, accesibles a través de la plataforma web Wanderer, una herramienta diseñada para la exploración interactiva de datos de metilación en muestras incluidos en The Cancer Genoma Atlas (TCGA) (170) (Figura 6).

Para todos los biomarcadores seleccionados se confirmó que los β-values correspondientes a las CpG analizadas en los datos de TCGA mostraban valores inferiores a 0.1 en muestras de mucosa colónica normal, con el fin de minimizar el riesgo de falsos positivos, y elevados en los adenocarcinomas de colon.

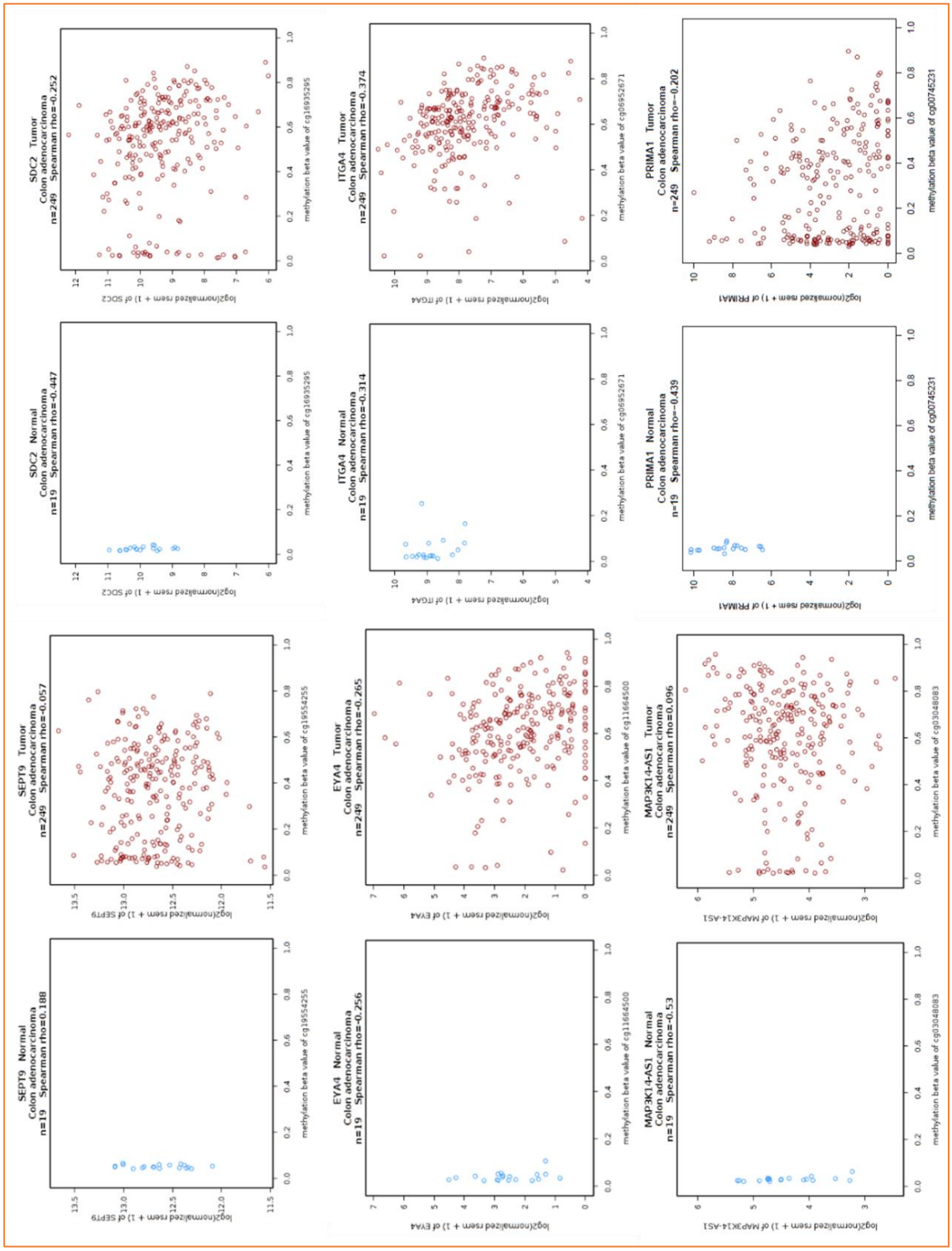


Figura 6. Distribución de los valores de metilación (ß-values) de CpG en los promotores de los genes SEPT9, SDC2, EYA4, ITGA4, MAP3K y PRIMA1 en muestras de mucosa colónica normal y tumoral de CCR en The Cancer Genoma Atlas (TCGA) obtenidos en la plataforma Wanderer. Cada punto representa una muestra individual de tejido normal (azul) o tumor (rojo)

Las secuencias de los cebadores y sondas específicas, así como la localización genómica de las CpG, se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores y sondas utilizados para la detección de biomarcadores metilados mediante ddPCR.

Gen asociado al biomarcador	Secuencia de cebadores y sondas (5'→3')	Posición genòmica amplificada (GRCh37/hg19)	Correspondencia ID cg (Illumina)
SEPT9	Cebador F: AGAGAATTTTGTTTGGTTGTTTAAATATAG Cebador R: AAAAAAAATTCCTCCCCTTCC Sonda M: 56-FAM/TGTAGAAGG/ZEN/ATTTTGCGTTCGG/3IABkFQ/ Sonda UM: 5HEX/TTGTAGAAG/ZEN/GATTTTGTGTTTGG/3IABkFQ/	chr17:75,369,001-75,369,078	cg19554255, cg16779463
SDC2	Cebador F: GAGTGTAGAAATTAATAAGTGAGAGGG Cebador R: CTTCCTCCTCCTACRCCTAC Sonda M: 56-FAM/CCGCCCGCA/ZEN/ACTACGCC/3IABkFQ/ Sonda UM: 5HEX/CCCACCACC/ZEN/CACAACTACACCC/3IABkFQ/	chr8:97,506,254-97,506,336	cg16935295
EYA4	Cebador F: GTGGATAGGATGGAAGTTT Cebador R: C(G/A)CCCCACCTCCCTAC Sonda M: 56-FAM/CGGAAGTCG/ZEN/GGAACGGTC/3IABkFQ/ Sonda UM: 5HEX/TGGGAATGG/ZEN/TTGGAGTG/3IABkFQ/	chr6:133,562,423-133,562,516	cg20787173, cg11664500, cg14287112
ITGA4	Cebador F: GTTGGAAATTTGTTAGGGAAATTAAT Cebador R: AAACTCCAAAACCTTACACCATAAC Sonda M: 56-FAM/CCGAAACGC/ZEN/TACCGCCC/3IABkFQ/ Sonda UM: 5HEX/CACCCAAAA/ZEN/CACTACCACCC/3IABkFQ/	chr2:182,322,712-182,322,791	cg11947981
MAP3K14-AS1	Cebador F: GGATTGGTGGGA(C/T)GTTGGAAATATTAGA Cebador R: ACCTAAATACC(G/A)ACTCCCTACCTATAAAAT Sonda M: 56-FAM/CGTCGGTGT/ZEN/TTGTGATGTCGTCGT/3IABkFQ/ Sonda UM: 5HEX/TGTTGGTGT/ZEN/TTGTGATGTTGTTGT/3IABkFQ/	chr17:43,339,469-43,339,567	cg03048083, cg01627847, cg08124910
PRIMA1	Cebador F: (C/T)GGTTGTT(C/T)GGGGTATTGG Cebador R: CCCAAC(G/A)AAAACTCCCTACC Sonda M: 56-FAM/CCGCCGCTA/ZEN/CCTCTCGC/3IABkFQ/ Sonda UM: 5HEX/CCTCCCACC/ZEN/ACTACCTCTCAC/3IABkFQ/	chr14:94,255,240-94,255,339	-

Diseño y mapeo genómico de los ensayos de metilación para los biomarcadores indicados. Se muestran las secuencias (5'→3') de cebadores forward (F) y reverse (R) y de las sondas alelo-específicas para metilado (M) y no metilado (UM), con fluoróforo 5' (FAM/HEX) y apagadores ZEN (interno) y 3IABkFQ (3'). La columna "Posición genómica amplificada" corresponde al intervalo del amplicón en el genoma de referencia GRCh37/hg19. La columna "Correspondencia ID cg (Illumina)" recoge las IDs cg (450K) cuyas CpG quedan dentro del amplicón; cuando aparecen varias IDs, el amplicón solapa más de un sitio CpG; "–" indica que no existe correspondencia en Illumina. Abreviaturas: F, forward; R, reverse; M, metilado; UM, no metilado

2. Estudio de marcadores de metilación en cfDNA

2.1. Conversión con bisulfito de ADN extraído

De manera previa al estudio de los marcadores de metilación, el ADN extraído del plasma se sometió a conversión con bisulfito con el EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research), siguiendo las indicaciones del fabricante (171).

El protocolo de conversión con bisulfito se realizó empleando 20 µL del cfDNA. Para reducir al mínimo la hidrólisis y garantizar una mayor eficiencia en la conservación de los fragmentos de cfDNA durante el procedimiento, se añadió a cada muestra 1 µL de ADN portador (200 ng de DNA exógeno) previamente al tratamiento con bisulfito. El procedimiento incluye la reacción química de desaminación de las citosinas no metiladas a uracilos, la purificación del ADN tratado en columnas de membrana de sílice y una elución final en un volumen de 10 µL.

El eluido de cfDNA tras la conversión con bisulfito se mantuvo a 4 °C y fue procesado de forma inmediata en el siguiente paso del procedimiento.

2.2. Preamplificación por PCR

De manera previa a la PCR digital, se realizó un paso de preamplificación destinado a enriquecer las secuencias de interés a partir del cfDNA tratado con bisulfito, con el objetivo de asegurar la disponibilidad suficiente de copias para su posterior partición en gotas y detección por ddPCR. La preamplificación se realizó con 5 ciclos, para evitar sesgos y mantener la proporcionalidad de metilación tras el pre-enriquecimiento. Para la realización del ensayo, se preparó una mezcla de reacción que contenía 10 µL de ddPCR™ Supermix for Probes, No dUTP (Bio-Rad, ref. 1863023), 9 µL de cfDNA tratado con bisulfito y una mezcla de los cebadores específicos a una concentración final de 18 µM. La temperatura de hibridación utilizada fue de 54 °C.

Una vez finalizada la reacción de PCR, se añadieron 45 ul de agua hasta un volumen final de 65 µL con el fin de homogeneizar la mezcla de ADN molde para el paso posterior de amplificación por PCR digital.

2.3. Análisis de marcadores por PCR digital

El cfDNA previamente convertido con bisulfito y sometido a preamplificación se utilizó como molde para la reacción de PCR digital basada en gotas (ddPCR) en el sistema QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad). Se realizaron un total de 6 reacciones para cada una de las muestras, que corresponden a cada uno de los marcadores epigenéticos en estudio. Para cada biomarcador, se diseñaron ensayos que incluían una sonda de hidrólisis marcada en 5' con HEX o FAM, con apagador interno ZEN y apagador terminal Iowa Black FQ, adquiridos a Integrated DNA Technologies. Estas sondas se diseñaron para hibridar con la secuencia CpG no metilada (HEX) y metilada (FAM), que permite la discriminación de los dos estados de metilación.

Para análisis, la mezcla de reacción incluyó 11 µL de ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP, Bio-Rad), 1 µL de una mezcla de primers (concentración final en reacción de 900 nM), sondas específicas para cada marcador (concentración final en reacción de 250 nM) y 10 µL de ADN convertido con bisulfito y preamplificado, para alcanzar un volumen final de 22 µL.

Las emulsiones se realizaron en el equipamiento Droplet Generator (Bio-Rad), para obtener alrededor de 20.000 gotas por reacción. En cada cartucho DG8™ se cargaron ocho mezclas de reacción de 20 µL cada una y 70 µL de Droplet Generation Oil for Probes (Bio-Rad). De cada mezcla generada se recuperaron 40 µL de emulsión que se sometieron a PCR en un termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems). El programa de temperaturas se definió con una activación inicial de la polimerasa a 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización (94 °C, 30 s) e hibridación/extensión durante 1 min a una temperatura optimizada para cada biomarcador (54 °C para *SEPT9*; 58 °C para *EYA4*; 60 °C para *SDC2*; 62 °C

para *ITGA4*, *MAP3K14-AS1* y *PRIMA1*). Finalmente se realizó un ciclo a 98 °C durante 10 min para la desactivación del enzima y se mantuvo a 4 °C hasta la lectura.

Las emulsiones amplificadas se leyeron en el QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad), que detecta de forma individual cada gota y registra su amplitud de fluorescencia en los canales FAM y HEX. Los datos se procesaron con QuantaSoft™ Analysis Pro (172) y solo se aceptaron los ensayos con un número de gotas generadas superior a 10000. Para discriminar señal y ruido, los umbrales se establecieron en cada carrera con los controles blancos sin ADN molde (NTC, del inglés Non Template Control) y los controles negativos y positivos de metilación. Los resultados se expresaron como fracción de metilación, definida como M/(M+UM), donde M corresponde a la señal del ADN metilado y UM a la del ADN no metilado, calculada a partir de las concentraciones (copias/µL) estimadas para cada canal (173).

2.4. Controles de metilación positivos y negativos

Para garantizar la calidad y fiabilidad del proceso de conversión por bisulfito y de los análisis posteriores de metilación, se emplearon controles comerciales estandarizados procedentes del kit Human Methylated & Non-Methylated DNA Set (Zymo Research) (174). El conjunto incluye ADN genómico humano metilado al 100 %, utilizado como control positivo para confirmar la preservación de las 5 metilcitosinas (5-mC) durante la conversión por bisulfito y la posterior amplificación, así como ADN genómico no metilado, utilizado como control negativo para verificar la conversión completa de citosinas no metiladas a uracilo y evaluar la eficiencia del procedimiento.

A partir de una concentración de cada ADN control de 250 ng/ul, se preparó una dilución de trabajo de 25 ng/µL en TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) y se procesaron un total de 25 ng de ADN de cada uno de los controles y en cada serie analítica.

3. Estudio de mutaciones en *KRAS* en cfDNA

3.1. Análisis por PCR digital de *KRAS*

El estudio de mutaciones en el gen *KRAS* se realizó a partir de cfDNA aislado a partir de 1 mL de plasma obtenido con el kit MAGicBead™ cfDNA Isolation Kit (Zymo Research). Con la finalidad de incrementar la sensibilidad de la técnica, el cfDNA fue sometido a una preamplificación inicial de 8 ciclos con una temperatura de hibridación de 59 °C, utilizando 2 µL de ADN en un volumen total de reacción de 20 µL, con cebadores específicos de la región de interés de *KRAS* en concentración final de 1 µM y 10 ul de la mezcla de reacción de PCR ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad).

Posteriormente, para la reacción de PCR digital se utilizaron 2 µL de ADN preamplificado y 10 ul de la mezcla de reacción ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) de Bio-Rad (175), ajustados a un volumen final de reacción de 20 ul. Los ensayos de ddPCR se configuraron en multiplex en una única reacción, incorporando simultáneamente los cebadores del exón 2 de *KRAS* (1 µM cada uno) y el panel completo de sondas dirigido a las mutaciones G12D, G12V, G12R, G12C y G13D, junto con la sonda para el alelo silvestre (WT). La concentración final de cada sonda se ensayó a 75nM y las secuencias utilizadas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores y sondas utilizados para la detección de mutaciones en *KRAS* mediante ddPCR.

Cebador (C)/Sonda (S)	Mutación detectada	Secuencia (5'→3')
Cebador F: Exón 2 *KRAS*	-	GTGTGACATGTTCTAATATAGTCACA
Cebador R: Exón 2 *KRAS*	-	TATCGTCAAGGCACTCTTGC
Sonda LNA *KRAS* WT	Alelo WT: G12G (GGT), G13G (GGC)	HEX/A+G+C+TGG+TGGC/3IABkFQ
Sonda LNA *KRAS* G12D	c.35G>A (GGT→GAT)	6-FAM/A+G+C+TG+A+TGGC/3IABkFQ
Sonda LNA *KRAS* G12V	c.35G>T (GGT→GTT)	6-FAM/AG+C+TG+T+TGGC/3IABkFQ
Sonda LNA *KRAS* G12R	c.34G>C (GGT→CGT)	6-FAM/A+GC+T+CG+TGGC/3IABkFQ
Sonda LNA *KRAS* G12C	c.34G>T (GGT→TGT)	6-FAM/A+G+C+TT+G+TGGC/3IABkFQ
Sonda LNA *KRAS* G13D	c.38G>A (GGC→GAC)	6-FAM/T+G+GT+G+A+CGTA/3IABkFQ

Secuencia de cebadores (C) y sondas (S) LNA específicas para las variantes de KRAS analizadas. Se indican las mutaciones objetivo (G12D/V/R/C, G13D) y la sonda para alelo silvestre; las secuencias se muestran en orientación 5'→3'. Los fluoróforos 5' son 6-FAM para variantes mutadas y HEX para el alelo silvestre; el apagador 3' es 3IABkFQ; los nucleótidos precedidos de "+" corresponden a bases LNA. Abreviaturas: C, cebador; S, sonda; LNA, locked nucleic acid; ddPCR, digital droplet PCR; WT, alelo silvestre; 6-FAM, 6-carboxifluoresceína; HEX, hexacloro-fluoresceína

Las reacciones se emulsionaron en aproximadamente 20.000 gotas por muestra utilizando el Droplet Generator (Bio-Rad). La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos y alineamiento-extensión a 59 °C durante 1 minuto, con una etapa final de inactivación a 98 °C durante 10 minutos.

Tras la PCR, las placas se analizaron con el lector QX200 Droplet Reader (Bio-Rad), que cuantificó la fluorescencia individual de cada ensayo. Los datos se procesaron con el software QuantaSoft Analysis Pro (Bio-Rad), permitiendo la discriminación entre gotas positivas y negativas para cada

mutación y el cálculo de la fracción alélica variante (VAF). Se aceptaron los ensayos con un número de gotas generadas superior a 10000. Para discriminar señal y ruido, se estimaron el límite del blanco (LB) y el límite de detección (LD) de acuerdo con un modelo estadístico basado en la distribución de Poisson para el cual la probabilidad de obtener dicho valor en una muestra negativa es inferior al 5%. A partir del LB, el LD se estimó como el número mínimo de eventos que puede distinguirse del fondo con una probabilidad superior al 95%. Para la estimación de estos parámetros se emplearon controles negativos analizados en condiciones equivalentes a las muestras clínicas.

3.2. Controles positivos y negativos de *KRAS*

Los controles positivos empleados para la validación de los ensayos de detección de mutaciones en *KRAS* consistieron en ADN genómico extraído de tejido tumoral de individuos con CCR, previamente caracterizados mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Estas muestras incluían las siguientes mutaciones y sus correspondientes fracciones alélicas variantes (VAF) analizadas por NGS: p.G12D (c.35G>A, 41 %), p.G12V (c.35G>T, 37 %), p.G12R (c.34G>C, 23 %) y p.G13D (c.38G>A, 33 %). Además, se incorporó un control positivo adicional para la variante p.G12C (c.34G>T), con una fracción alélica variante del 37 %, obtenido a partir de cfDNA de un paciente con CCR en estadio IV, que previamente había sido analizado mediante secuenciación profunda de nueva generación con el kit AVENIO cfDNA Targeted, Roche (176).

En todos los casos, la cantidad de ADN analizado de cada control se realizó con 2 ng de partida.

4. Marcadores tumorales en suero

La determinación sérica de marcadores tumorales se realizó a partir de muestras de sangre obtenidas en tubos con gel separador, que fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos

El CEA se analizó mediante inmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA, Elecsys CEA, Roche Diagnostics) en la plataforma Cobas® e801 (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland) (177). El punto de corte se estableció en 5 ng/mL. La interpretación de los resultados tuvo en cuenta la posibilidad de elevaciones inespecíficas, descritas en individuos fumadores y en diversas patologías no malignas.

El antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9) se analizó mediante inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA, CA19-9XR, Abott Diagnostics), en la plataforma Alinity® i (Abbott Diagnostics GmbH, Wiesbaden, Germany) (178). El punto de corte en nuestro laboratorio para esta prueba se encuentra en 37 kU/L.

5. Detección de sangre oculta en heces

Las muestras de heces se almacenaron a 4–8 °C hasta su análisis para el que se empleó el test rápido inmunocromatográfico FOB MonlabTest® (Monlab SL, ref. CHEM-9001C-25/50).

La detección de sangre oculta en heces se basa en un inmunoensayo tipo sándwich, en el que la tira reactiva del casete contiene anticuerpos monoclonales anti-hemoglobina humana. Para la realización del test, se aplicaron 2–3 gotas del extracto fecal en el pocillo del casete, y la lectura se efectuó a los 5 minutos. La presencia de hemoglobina en el extracto fecal origina un complejo inmunológico que migra por capilaridad y produce una línea coloreada. El límite de detección del método es de 40 µg/L de hemoglobina, equivalente a 10 µg de hemoglobina por gramo (hb/g) de heces, según los datos proporcionados por el fabricante (179).

6. Análisis de datos

El análisis estadístico se diseñó con un doble objetivo: i) caracterizar la distribución de las variables clínicas y analíticas de la cohorte, y ii) evaluar el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores basados en cfDNA para la detección de AA, CCR y NA. Todos los análisis se realizaron únicamente sobre los casos con muestra evaluable para cada determinación, sin imputación de datos perdidos.

Para los marcadores epigenéticos y para el análisis de mutaciones en *KRAS*, los resultados se clasificaron inicialmente de forma binaria (positivo/negativo) a partir de los criterios de positividad y de los límides de detección establecidos en la fase de validación analítica. A partir de tablas de contingencia 2 × 2, y tomando como referencia el diagnóstico clínico e histopatológico, se calcularon la sensibilidad, la especificidad de cada biomarcador de forma individual y en combinación. Dado el diseño caso-control del estudio, los valores predictivos positivo y negativo obtenidos directamente de la cohorte se consideraron descriptivos. Para aproximar la interpretación clínica del ensayo, los VPP y VPN del panel combinado se ajustaron a la prevalencia esperada de enfermedad en individuos con FIT positivo procedentes de programas poblacionales de cribado. Para ello, se asumió una prevalencia del 4% para CCR, del 30% para AA y del 34% para NA.

De forma adicional, se realizó un análisis exploratorio de puntos de corte alternativos para los marcadores epigenéticos utilizando el porcentaje de metilación como variable continua. La capacidad discriminativa de cada marcador se evaluó mediante curvas ROC y AUC. Los puntos de corte se seleccionaron con el objetivo de alcanzar una especificidad mínima del 90% en la detección de NA.

Las variables cuantitativas se expresaron como media ± desviación estándar o como mediana y rango intercuartílico, según su distribución. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk. Para la comparación entre dos grupos independientes se empleó la prueba t de

Student o la prueba U de Mann–Whitney, según correspondiera; en comparaciones entre tres o más grupos se utilizó ANOVA o la prueba de Kruskal–Wallis, con análisis post hoc adecuados para comparaciones múltiples cuando fue necesario. Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas y porcentajes, y se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher. Las comparaciones entre métodos diagnósticos se plantearon con carácter descriptivo.

Además del análisis global, se realizaron comparaciones estratificadas según estadio tumoral, agrupando los casos de CCR en enfermedad inicial (estadios I–II) y enfermedad avanzada (estadios III–IV), con el objetivo de explorar la influencia de la carga tumoral sobre la detectabilidad de los biomarcadores. Dado el tamaño muestral limitado en algunos subgrupos, estos análisis se interpretaron con carácter exploratorio. La gestión y depuración de la base de datos se realizó con Microsoft Excel® (Microsoft Office Professional Plus 2019), y los análisis estadísticos se llevaron a cabo con IBM SPSS Statistics® (versión 31). El análisis gráfico y la generación de curvas ROC se realizaron mediante el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.). En todos los contrastes se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

7. Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIm) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y se desarrolló de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, así como con la normativa nacional y europea vigente en materia de investigación biomédica y protección de datos (Reglamento [UE] 2016/679 y Ley Orgánica 3/2018, de Protección de Datos Personales y Garantía de Derechos Digitales).

Todos los individuos fueron informados de los objetivos, procedimientos, posibles beneficios y riesgos asociados a su participación. Tras recibir la explicación oral y la hoja de Información al paciente (anexo I), se firmó el consentimiento informado (anexo II) por el investigador responsable y el participante. La participación en el estudio fue completamente voluntaria, sin compensación económica y sin interferir en el manejo médico habitual. La hoja de información entregada a los participantes especificaba la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento (anexo III). La información incluyó los riesgos mínimos asociados a la venopunción, así como el acceso a los datos clínicos y la codificación de las muestras para preservar la confidencialidad. El destino de las muestras biológicas sobrantes quedó almacenado en la colección autorizada C.0007287, previo consentimiento específico del paciente.

Resultados

1. Primer objetivo: Desarrollar y optimizar un procedimiento de análisis de cfDNA basado en un panel de biomarcadores epigenéticos seleccionados para la detección de CCR y lesiones precursoras avanzadas mediante ddPCR

1.1. Optimización de condiciones para la amplificación de las regiones seleccionadas

Como paso previo al estudio del panel de marcadores epigenéticos por PCR digital, se llevó a cabo una sistemática de optimización de las condiciones de amplificación con PCR convencional específicas para cada región diana. Las condiciones de la PCR incluyeron 35 ciclos de amplificación de 200 ng de ADN genómico humano previamente tratado con bisulfito con un gradiente de temperatura comprendido entre 50 °C y 64 °C para la etapa de alineamiento durante 30 segundos y una etapa de extensión a 72 °C durante 2 min 30 segundos. Los gradientes de temperatura para cada marcador se ajustaron en función a las temperaturas de alineamientos teóricas. Los productos amplificados se visualizaron mediante sistema QIAxcel y se seleccionó la temperatura de alineamiento que mostraba una mayor intensidad sin la aparición de bandas inespecíficas.

Una vez seleccionada la temperatura óptima para cada marcador, se realizó una PCR adicional para evaluar la especificidad de la amplificación con varios controles. Para ello se confirmó que no existía amplificación de los marcadores en los NTC y en ADN genómico sin tratar con bisulfito (ver *SEPT9* en figura 7). El criterio de aceptación de una amplificación específica se basó en la obtención de una banda del tamaño esperado y ausencia de señal en los controles negativos.

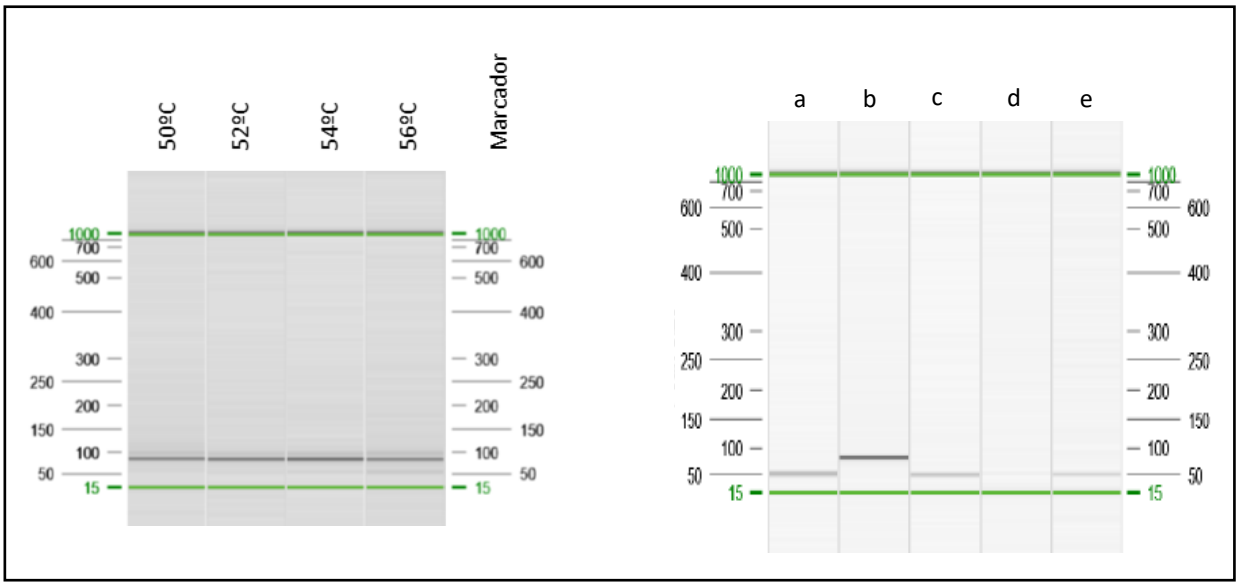


Figura 7. Optimización y verificación de la amplificación de la región diana del marcador SEPT9 Visualización de los productos de PCR en el sistema QIAxcel. (A) Gradiente de temperatura entre 50-56ºC utilizado para la optimización de las condiciones de amplificación de SEPT9. (B) Ensayo de especificidad de la amplificación del amplicón para SEPT9, que muestra una única banda del tamaño esperado en la línea b y ausencia de señal en los controles negativos (a = NTC, b = ADN genómico tratado con bisulfito, c = marcador de peso molecular tratado con bisulfito, d = ADN genómico sin tratamiento con bisulfito, e = marcador de peso molecular sin tratamiento con bisulfito)

El análisis de los resultados confirmó la amplificación específica de los pares de cebadores diseñados para cada secuencia diana. La temperatura de alineamiento óptima seleccionada fue de 54ºC para *SEPT9*, 58ºC para *EYA4*, 60ºC para *SDC2* y de 62ºC para *ITGA4*, MAP3K-AS14 y *PRIMA1* (figura 8).

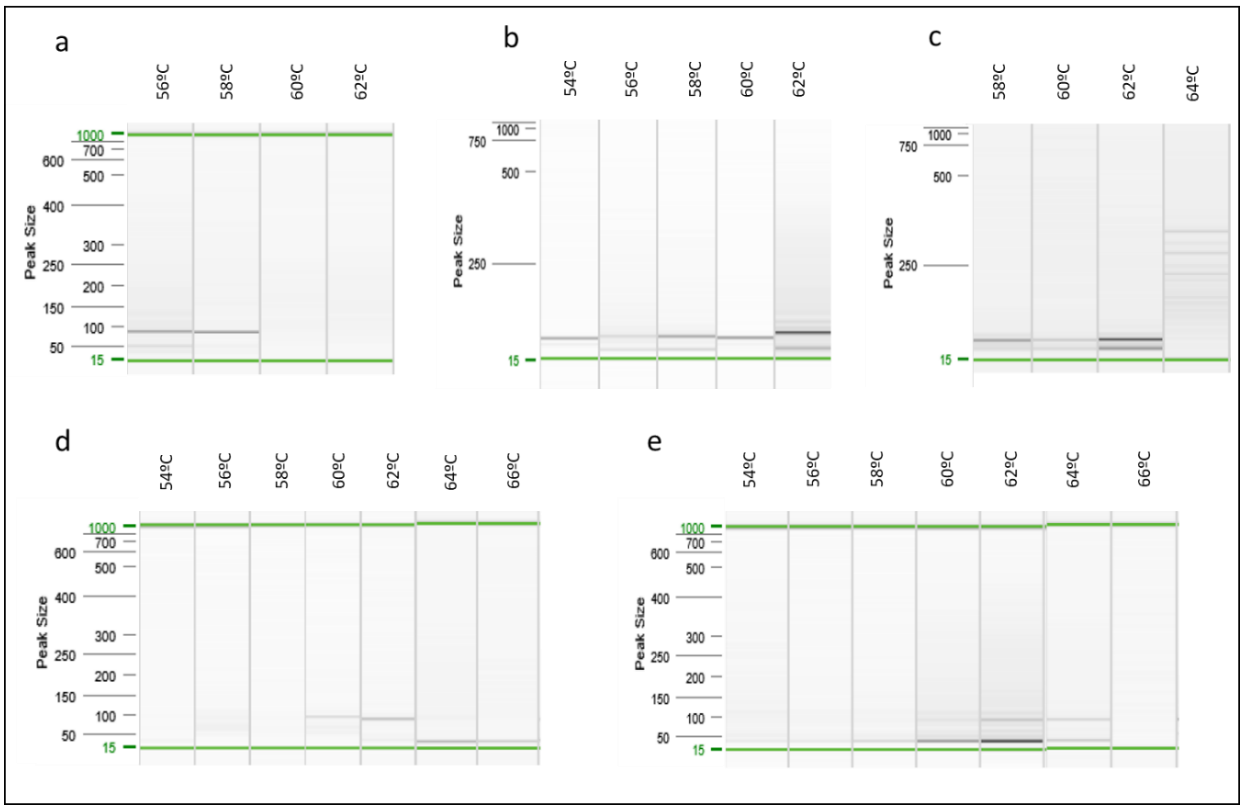


Figura 8. Optimización de las condiciones de amplificación de las regiones diana del resto de marcadores. Visualización de los productos de PCR en el sistema QIAxcel. Las imágenes muestran los perfiles de amplificación obtenidos para cada marcador: (a) EYA4, (b) SDC2, (c) ITGA4, (d) MAP3K14-AS1 y (e) PRIMA1

1.2. Verificación de la especificidad de las sondas marcadas

El siguiente paso realizado tras la confirmación de la amplificación de las regiones diana, fue verificar la especificidad de las sondas de hidrólisis empleadas en los ensayos de PCR digital. Para ello, se analizaron distintos controles mediante PCR digital con el fin de confirmar la correcta hibridación y la ausencia de señales inespecíficas. Se incluyeron las siguientes muestras: NTC, control negativo constituido por ADN genómico comercial no metilado (25 ng, correspondiente a 1 µL de una dilución 1:10) y control positivo de ADN genómico comercial completamente metilado.

La sonda marcada con FAM mostró señal exclusiva en el control metilado, mientras que la sonda marcada con HEX presentó amplificación únicamente en el control negativo no metilado, confirmando la correcta especificidad y discriminación de ambas sondas (figura 9 y 10).

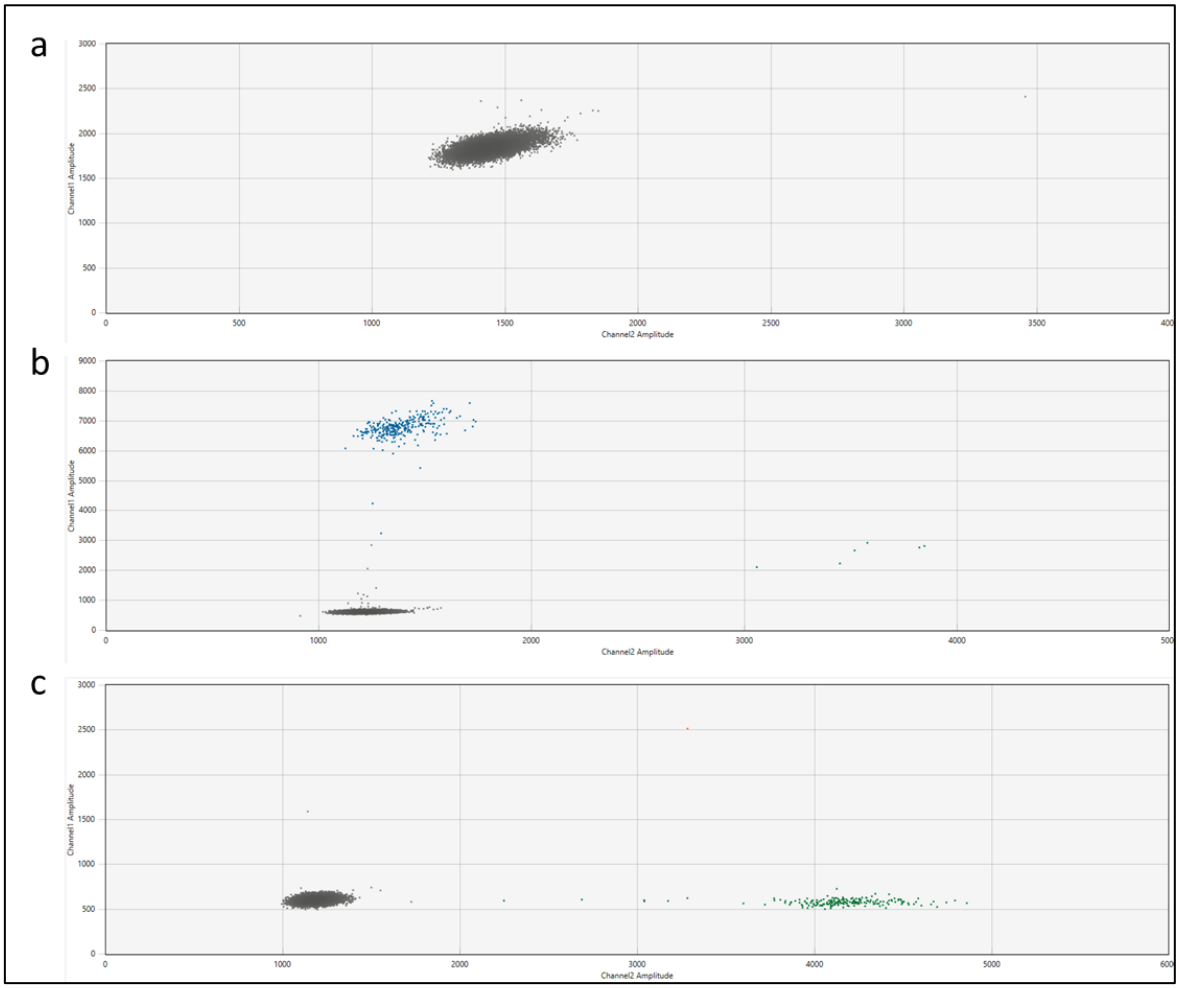


Figura 9. Verificación de la especificidad de la sonda marcada para SEPT9 mediante PCR digital. Gráficos de amplitud de fluorescencia en dos dimensiones obtenidos mediante PCR digital para la región diana de SEPT9. En el canal 1 (eje Y) se registra la fluorescencia FAM, correspondiente a la detección del marcador metilado, y en el canal 2 (eje X) la fluorescencia HEX, asociada al marcador no metilado. Se incluyen a) NTC, b) control positivo con ADN genómico metilado, y c) control negativo con ADN genómico no metilado

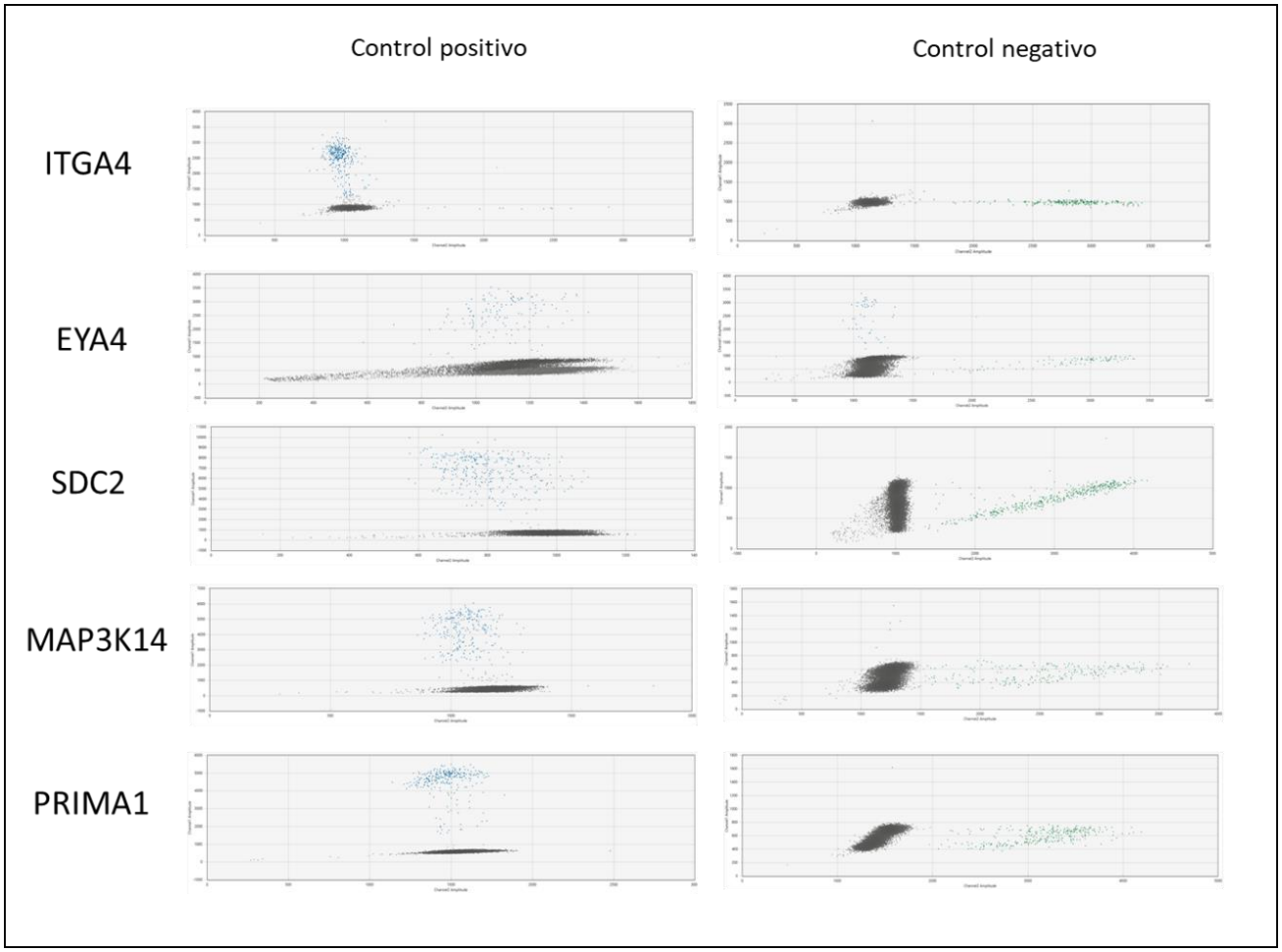


Figura 10. Verificación de la especificidad de las sondas marcadas para los marcadores en EYA4, SDC2, ITGA4, MAP3K14-AS1 y PRIMA1 mediante PCR digital. Gráficos de amplitud de fluorescencia en dos dimensiones obtenidos mediante PCR digital para la verificación de la especificidad de las sondas FAM (secuencia metilada) y HEX (secuencia no metilada) correspondientes a cada marcador. Se incluyen los resultados para el control positivo de metilación y el control negativo no metilado. En todos los marcadores, excepto en EYA4, se observó fluorescencia específica para cada control (FAM para controles positivos y HEX para controles negativos), que confirman la correcta especificidad de las sondas

Los resultados obtenidos confirman la especificidad del diseño del panel de biomarcadores epigenéticos, al demostrar una amplificación eficiente de las regiones diana bajo las condiciones de temperatura optimizadas. La detección de fluorescencia en FAM en los controles positivos

de metilación con ausencia de fluorescencia en HEX y viceversa con los controles negativos de metilación, avala la especificidad de los ensayos para la discriminación entre secuencias metiladas y no metiladas. Estos ensayos iniciales proporcionaron la base para avanzar hacia las siguientes etapas de validación analítica, que incluyó la determinación de los límites de detección para cada marcador.

1.3. Evaluación de la sensibilidad analítica del método en muestras de plasma

Bajo las condiciones experimentales previamente establecidas, se analizó una de las dos muestras de plasma obtenidas de los individuos reclutados en el Programa de Cribado de CCR de Catalunya (n = 50). El cfDNA fue extraído, sometido a conversión con bisulfito y posteriormente dividido en seis fracciones independientes, destinadas al análisis individual de cada uno de los marcadores epigenéticos.

La Tabla 3 recoge, para cada individuo, la concentración de cfDNA analizada, el número de reacciones positivas detectadas en los canales FAM y HEX, así como la abundancia relativa de metilación estimada para cada marcador. De los 50 individuos evaluados, únicamente cuatro mostraron una señal en FAM igual o superior a tres eventos para alguno de los biomarcadores analizados. En concreto, *MAP3K14-AS1* presentó señal positiva en los individuos 12 y 36, ambos pertenecientes al grupo AA. Por su parte, *PRIMA1* mostró señal en los individuos 6 y 36 del grupo AA y en el individuo 21 del grupo CCR.

El análisis del panel de marcadores epigenéticos mostró una baja tasa de detección de señal en las muestras analizadas, limitada únicamente a dos de los biomarcadores evaluados. Además, se observó un escaso número de eventos positivos para las sondas marcadas en HEX, específicas de las secuencias no metiladas (tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos en muestras de individuos en las condiciones iniciales

Paciente	Grupo	ng ADN/reacción	SEPT9			EYA4			SDC2			ITGA4			MAP3K14-AS1			PRIMA1			Resultado panel biomarcadores
			M	UM	% M/(M+UM)	M	UM	% M/(M+UM)	M	UM	% M/(M+UM)	M	UM	% M/(M+UM)	M	UM	% M/(M+UM)	M	UM	% M/(M+UM)	
1	NV	1,29	0	31	0,0%	0	48	0,0%	0	155	0,0%	0	109	0,0%	1	57	1,7%	0	49	0,0%	Neg
2	NV	1,47	0	51	0,0%	0	53	0,0%	0	134	0,0%	0	105	0,0%	-	-	-	0	28	0,0%	Neg
3	VE	0,95	2	31	6,0%	0	28	0,0%	0	62	0,0%	1	36	2,7%	-	-	-	1	23	4,2%	Pos
5	VE	0,76	0	34	0,0%	0	34	0,0%	0	69	0,0%	1	61	1,6%	1	54	1,8%	1	49	2,0%	Neg
6	VE	1,33	1	81	1,2%	1	70	1,4%	0	126	0,0%	0	114	0,0%	1	80	1,2%	6	91	6,2%	Pos
7	NV	1,36	1	40	2,4%	0	32	0,0%	0	114	0,0%	1	73	1,4%	0	38	0,0%	0	55	0,0%	Neg
8	NV	0,82	0	29	0,0%	0	26	0,0%	0	96	0,0%	0	59	0,0%	0	32	3,0%	0	43	0,0%	Neg
9	NV	1,50	0	43	0,0%	0	60	0,0%	0	110	0,0%	0	54	0,0%	0	51	0,0%	0	83	0,0%	Neg
10	NV	1,02	0	35	0,0%	0	30	0,0%	0	67	0,0%	0	41	0,0%	0	44	0,0%	1	57	1,7%	Neg
11	VE	1,17	0	36	0,0%	0	52	0,0%	0	95	0,0%	0	72	0,0%	1	54	1,8%	1	97	1,0%	Neg
12	VE	1,40	0	30	0,0%	1	35	2,8%	0	70	0,0%	0	42	0,0%	5	40	11,1%	0	78	0,0%	Pos
13	VE	1,68	0	44	2,2%	0	49	0,0%	0	146	0,0%	0	70	0,0%	0	40	0,0%	0	103	0,0%	Neg
14	NV	0,82	-	-	-	-	-	-	0	47	0,0%	0	29	0,0%	0	32	0,0%	0	35	0,0%	Neg
15	NV	0,81	0	35	0,0%	0	44	0,0%	0	67	0,0%	0	18	0,0%	0	22	0,0%	0	49	0,0%	Neg
16	NV	1,39	0	62	0,0%	0	74	0,0%	0	107	0,0%	0	45	0,0%	0	51	0,0%	0	58	0,0%	Neg
17	CCR	2,66	0	117	0,0%	0	135	0,0%	0	183	0,0%	0	163	0,0%	0	167	0,0%	1	116	0,9%	Neg
18	NV	1,85	1	73	1,3%	1	61	1,6%	0	134	0,0%	0	102	0,0%	0	78	0,0%	0	79	0,0%	Neg
19	VE	1,55	0	51	0,0%	2	58	3,4%	0	107	0,0%	0	59	0,0%	0	49	0,0%	0	68	0,0%	Pos
20	NV	1,15	0	53	0,0%	0	53	0,0%	1	120	0,8%	0	46	0,0%	1	67	1,5%	1	39	2,5%	Neg
21	CCR	1,36	0	35	0,0%	0	48	0,0%	1	81	1,2%	1	72	1,4%	0	42	0,0%	3	52	5,5%	Pos
23	NV	0,62	0	33	0,0%	0	32	0,0%	0	54	0,0%	0	26	0,0%	0	14	0,0%	0	35	0,0%	Neg
24	NV	0,80	0	23	0,0%	0	22	0,0%	-	-	-	0	42	0,0%	0	25	0,0%	0	50	0,0%	Neg
25	NV	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	13	0,0%	0	21	0,0%	0	17	0,0%	Neg
26	NV	0,65	-	-	-	0	23	0,0%	0	18	0,0%	0	31	0,0%	0	12	0,0%	0	50	0,0%	Neg
27	NV	0,75	0	33	0,0%	0	37	0,0%	0	62	0,0%	0	26	0,0%	0	32	0,0%	0	26	0,0%	Neg
28	VE	0,78	1	15	6,3%	0	31	0,0%	0	14	0,0%	0	41	0,0%	0	26	0,0%	0	54	0,0%	Neg
29	VE	1,59	0	122	0,0%	0	63	0,0%	0	38	0,0%	0	159	0,0%	0	138	0,0%	2	123	1,6%	Pos
30	NV	0,78	0	51	0,0%	0	63	0,0%	0	11	0,0%	0	79	0,0%	0	63	0,0%	0	66	0,0%	Neg
31	NV	0,72	0	37	0,0%	0	10	0,0%	0	27	0,0%	0	19	0,0%	0	37	0,0%	0	37	0,0%	Neg
32	NV	0,49	1	15	6,3%	-	-	-	0	25	0,0%	0	26	0,0%	0	13	0,0%	1	14	6,7%	Neg
33	NV	1,21	0	54	0,0%	0	77	0,0%	0	128	0,0%	0	118	0,0%	0	78	0,0%	0	85	0,0%	Neg
34	VE	2,16	0	57	0,0%	0	26	0,0%	0	44	0,0%	0	87	0,0%	0	43	0,0%	0	76	0,0%	Neg
35	NV	0,47	0	12	0,0%	0	12	0,0%	-	-	-	0	24	0,0%	0	13	0,0%	-	-	-	Neg
36	VE	0,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	29	36,9%	8	11	42,1%	4	17	19,0%	Pos
37	NV	0,80	0	16	0,0%	0	25	0,0%	0	30	0,0%	0	36	0,0%	-	-	-	0	17	0,0%	Neg
38	NV	0,94	0	16	0,0%	0	36	0,0%	1	24	3,9%	0	63	0,0%	0	15	0,0%	0	35	0,0%	Neg
39	NV	1,27	0	21	0,0%	0	34	0,0%	0	53	0,0%	0	47	0,0%	-	-	-	0	55	0,0%	Neg
40	VE	0,87	0	11	0,0%	0	29	0,0%	0	30	0,0%	0	30	0,0%	-	-	-	1	21	4,5%	Neg
41	VE	0,74	0	29	0,0%	0	27	0,0%	0	35	0,0%	1	20	4,8%	-	-	-	0	27	0,0%	Neg
42	VI	1,20	0	32	0,0%	1	51	2,0%	1	28	3,4%	0	61	0,0%	0	23	0,0%	0	39	0,0%	Neg
43	NV	0,84	-	-	-	0	22	0,0%	1	14	6,4%	0	28	0,0%	-	-	-	0	11	0,0%	Neg
44	NV	0,66	0	10	0,0%	0	20	0,0%	0	20	0,0%	0	23	0,0%	0	10	0,0%	0	12	0,0%	Neg
45	NV	0,74	0	11	0,0%	0	18	0,0%	0	39	0,0%	0	36	0,0%	0	12	0,0%	0	30	0,0%	Neg
46	NV	0,73	0	16	0,0%	0	23	0,0%	1	39	2,4%	0	53	0,0%	0	16	0,0%	0	40	0,0%	Neg
47	NV	0,96	0	17	0,0%	0	29	0,0%	0	42	0,0%	0	51	0,0%	0	14	0,0%	1	41	2,4%	Neg
48	NV	2,14	0	22	0,0%	0	56	0,0%	0	91	0,0%	0	70	0,0%	-	-	-	0	61	0,0%	Neg
49	VE	1,05	0	12	0,0%	0	23	0,0%	1	47	0,0%	0	42	0,0%	0	18	0,0%	0	28	0,0%	Neg
50	NV	0.85	0	11	0,0%	-	-	-	0	24	0,0%	0	33	0,0%	0	17	0,0%	0	24	0,0%	Neg
51	NV	1.11	0	20	0,0%	-	-	-	1	47	2,1%	1	44	2,2%	0	21	0,0%	1	39	2,5%	Neg
52	NV	1.22	1	24	4,0%	-	-	-	0	23	0,0%	1	42	2,3%	0	25	0,0%	0	28	0,0%	Neg

M: eventos detectados en el canal FAM; UM: eventos detectados en el canal HEX; NV: no vigilancia; AA: adenoma avanzado; CCR: cáncer colorrectal.

1.4. Evaluación de la sensibilidad analítica en plasma tras la optimización del proceso por preamplificación de la muestra

Con el objetivo de incrementar la cantidad de ADN disponible por reacción y mejorar la sensibilidad de detección del panel de metilación, cada muestra fue sometida a una etapa de preamplificación previa a la PCR digital, siguiendo las condiciones previamente descritas en el apartado de *Material y métodos*.

Para evaluar el impacto de la preamplificación, se comparó la señal total (eventos marcados con FAM más los eventos marcados con HEX) obtenida antes y después de la etapa de preamplificación en las muestras de los individuos 13, 14 y 21.

Se observó un incremento en el número total de eventos de amplificación detectados tras la preamplificación en todos los biomarcadores analizados. En las muestras sin preamplificación, el número total de eventos fue limitado; por ejemplo, para *SEPT9* se detectaron 45 y 9 eventos en los individuos 13 y 14, respectivamente. Tras la preamplificación, estos valores aumentaron hasta 693 y 459 eventos.

Un patrón similar se observó en el resto de biomarcadores en los individuos 13, 14 y 21. Para *EYA4*, la señal pasó de 49, 10 y 48 eventos sin preamplificación a 719, 422 y 233 eventos. En *SDC2*, el incremento fue especialmente marcado, pasando de 146, 47 y 81 eventos a más de 1386, 818 y 1056 eventos tras la preamplificación. Para las dianas seleccionadas en *ITGA4*, *MAP3K14-AS1* y *PRIMA1*, los aumentos oscilaron entre 5 y 10 veces respecto a los valores iniciales, alcanzando hasta 830 eventos en *PRIMA1* tras la preamplificación (individuo 13).

El incremento en el número de eventos detectados osciló entre 6 y 15 veces según el biomarcador.

Una vez establecido el protocolo definitivo, que incorporó la etapa previa de preamplificación del ADN bisulfitado y se procedió a reanalizar las muestras de aquellos individuos con volumen

adicional de plasma disponible, aplicando las condiciones optimizadas del ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en un apartado posterior.

1.5. Definición de umbrales de positividad del panel de marcadores epigenéticos

Para establecer los criterios de positividad de cada biomarcador, se emplearon los controles negativos de metilación incluidos en un total de diez tandas de análisis independientes. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5, que resume la distribución de los eventos detectados en los controles y los umbrales definidos para la clasificación de resultados positivos en las muestras de estudio.

Tabla 5: Resultados obtenidos en los controles negativos de metilación analizados en diez ensayos independientes

	SEPT9 (eventos M)	*SEPT9* (eventos UM)	*SDC2* (eventos M)	*SDC2* (eventos UM)	*ITGA4* (eventos M)	*ITGA4* (eventos UM)	*MAP3K14-AS1* (eventos M)	*MAP3K14-AS1* (eventos UM)	*MAP3K14-AS1* (% M/(M+UM))	*PRIMA1* (eventos M)	*PRIMA1* (eventos UM)
Ensayo 1	0	3505	0	3826	1	1484	6	1363	0,4	0	1185
Ensayo 2	0	6141	0	7915	1	2879	7	3438	0,2	0	4378
Ensayo 3	-	-	0	3834	1	1087	40	2363	0,0	0	2738
Ensayo 4	0	4517	2	6129	3	3188	65	2949	2,0	0	2922
Ensayo 5	0	3277	0	3070	0	291	27	1370	1,9	0	1657
Ensayo 6	0	1538	0	2572	0	622	9	883	1,0	0	981
Ensayo 7	0	2277	0	2546	0	916	16	1013	1,5	3	1374
Ensayo 8	0	2281	0	2024	2	818	28	1068	2,4	0	1075
Ensayo 9	0	1141	0	2535	4	908	31	1356	2,1	1	1268
Ensayo 10	0	2158	1	2864	1	1551	31	2054	1,4	0	1678
LOD (M)	3		3		5				2	3	

M: eventos detectados en el canal FAM, correspondiente al estado del marcador metilado; UM: eventos detectados en el canal HEX, correspondiente al estado del marcador no metilado

El análisis de estos controles permitió determinar el umbral de señal basal en el canal FAM y descartar la presencia de eventos falsos positivos. En base en estos datos, se estableció un límite de detección de 3 eventos para los marcadores *SEPT9*, *SDC2* y *PRIMA1*, y de 5 eventos para *ITGA4*. En el caso de *MAP3K14-AS1*, debido a la mayor señal de fondo, se utilizó como criterio de positividad una abundancia relativa superior al 2% respecto al total de eventos marcados detectados en la reacción.

Para el marcador *EYA4*, se observó una señal elevada en el canal FAM en el control negativo de metilación, lo que impidió definir el punto de corte a partir de dichos controles. En este caso, se estableció un umbral de positividad de 3 eventos en FAM como criterio para la interpretación de resultados.

1.6. Evaluación del panel de metilación en muestras con ctDNA confirmado por secuenciación masiva

La fase final de la optimización del ensayo consistió en el análisis de muestras de cfDNA de individuos con CCR metastásico que previamente habían sido caracterizadas por NGS a alta profundidad utilizando el panel Avenio targeted ctDNA kit (176). Para este análisis, se emplearon entre 40 y 50 ng de cfDNA como material de partida.

El estudio por ddPCR se realizó a partir del cfDNA obtenido del mismo plasma de origen, lo que permitió una comparación directa entre los resultados. La cantidad de cfDNA empleada para el análisis de los marcadores epigenéticos fue variable en función de la disponibilidad de muestra (figura 11).

Todas las muestras incluidas en esta comparación presentaban al menos una variante somática patogénica detectada por NGS con una VAF superior al 0,5%, que confirma la presencia de ctDNA en todas las muestras analizadas.

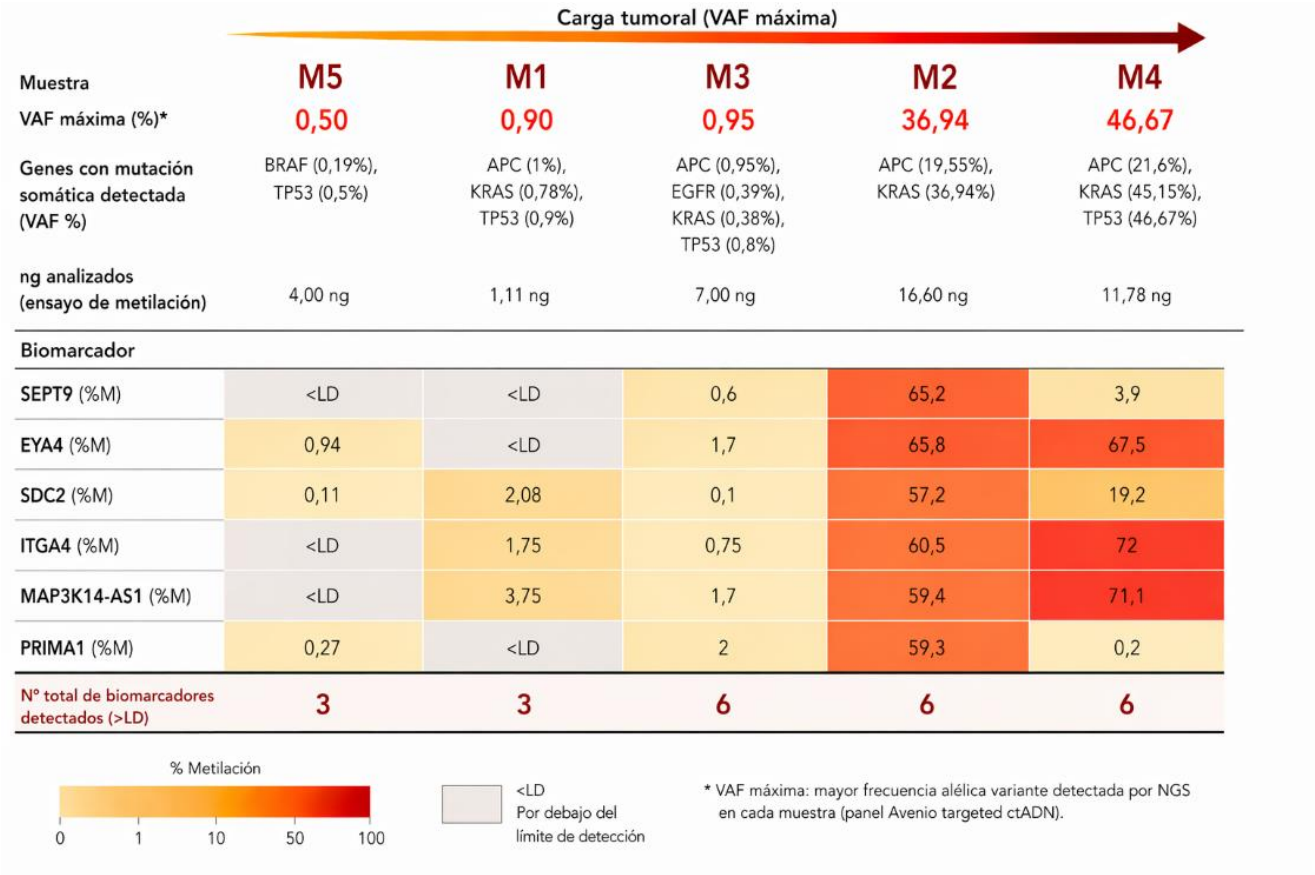


Figura 11. Detección de marcadores epigenéticos en muestras de cfDNA de pacientes con CCR metastásico con ctDNA previamente confirmado por NGS. Se muestran los porcentajes de metilación (%M) obtenidos para los seis biomarcadores analizados (SEPT9, EYA4, SDC2, ITGA4, MAP3K14-AS1 y PRIMA1) en cinco muestras de plasma. Las muestras se ordenaron en función de la carga tumoral estimada mediante la frecuencia alélica variante máxima (VAF máxima) detectada por NGS con el panel Avenio targeted ctDNA. En la parte superior se indican, para cada muestra, la VAF máxima, las mutaciones somáticas detectadas y la cantidad de cfDNA analizada en el ensayo de metilación. Los valores inferiores al límite de detección (<LD) se representan en gris. En la fila inferior se resume el número total de biomarcadores detectados por encima del límite de detección en cada muestra

En las muestras con mayor carga de ctDNA (muestras 2 y 4), así como en la muestra 3, que presentaba VAF cercanas al 1% para varias alteraciones, los seis marcadores epigenéticos analizados se detectaron por encima del límite de detección establecido.

En las muestras con menor carga tumoral (muestras 1 y 5), que presentaban VAF iguales o inferiores al 1%, se detectaron tres marcadores epigenéticos por encima del límite de detección.

2. Segundo objetivo: Desarrollar un ensayo multiplex de ddPCR para la detección de mutaciones frecuentes de *KRAS* en cfDNA

2.1. Evaluación de la especificidad analítica del ensayo multiplex para variantes de *KRAS*

Como fase inicial del desarrollo del método, se evaluó la especificidad analítica de las sondas mediante ensayos individuales utilizando fragmentos sintéticos tipo gBlocks (Integrated DNA Technologies, IDT), diseñados de forma específica cada una de las variantes de *KRAS* incluidas en el ensayo. Los ensayos de ddPCR realizados con fragmentos sintéticos mostraron ausencia de reactividad cruzada entre sondas, incluso en condiciones próximas a la saturación de señal. Cada sonda generó señal exclusivamente en presencia de su secuencia diana.

Posteriormente, la especificidad del ensayo se verificó en un contexto más próximo a la práctica clínica mediante el análisis de controles positivos previamente caracterizados por secuenciación de nueva generación (NGS). Estos controles correspondían a muestras con las siguientes mutaciones y frecuencias alélicas variantes (VAF, del inglés variant allele frequency): p.G12D (c.35G>A, 41%), p.G12V (c.35G>T, 37%), p.G12R (c.34G>C, 23%) y p.G13D (c.38G>A, 33%). Adicionalmente, se incorporó un control positivo específico para la variante p.G12C (c.34G>T) con una VAF del 37%, obtenido a partir de cfDNA de un paciente con CCR en estadio IV.

En todos los casos, las sondas marcadas con FAM mostraron amplificación específica de las secuencias mutadas, mientras que la sonda marcada con HEX detectó las secuencias no mutadas, sin observarse señales inespecíficas relevantes (Figura 12).

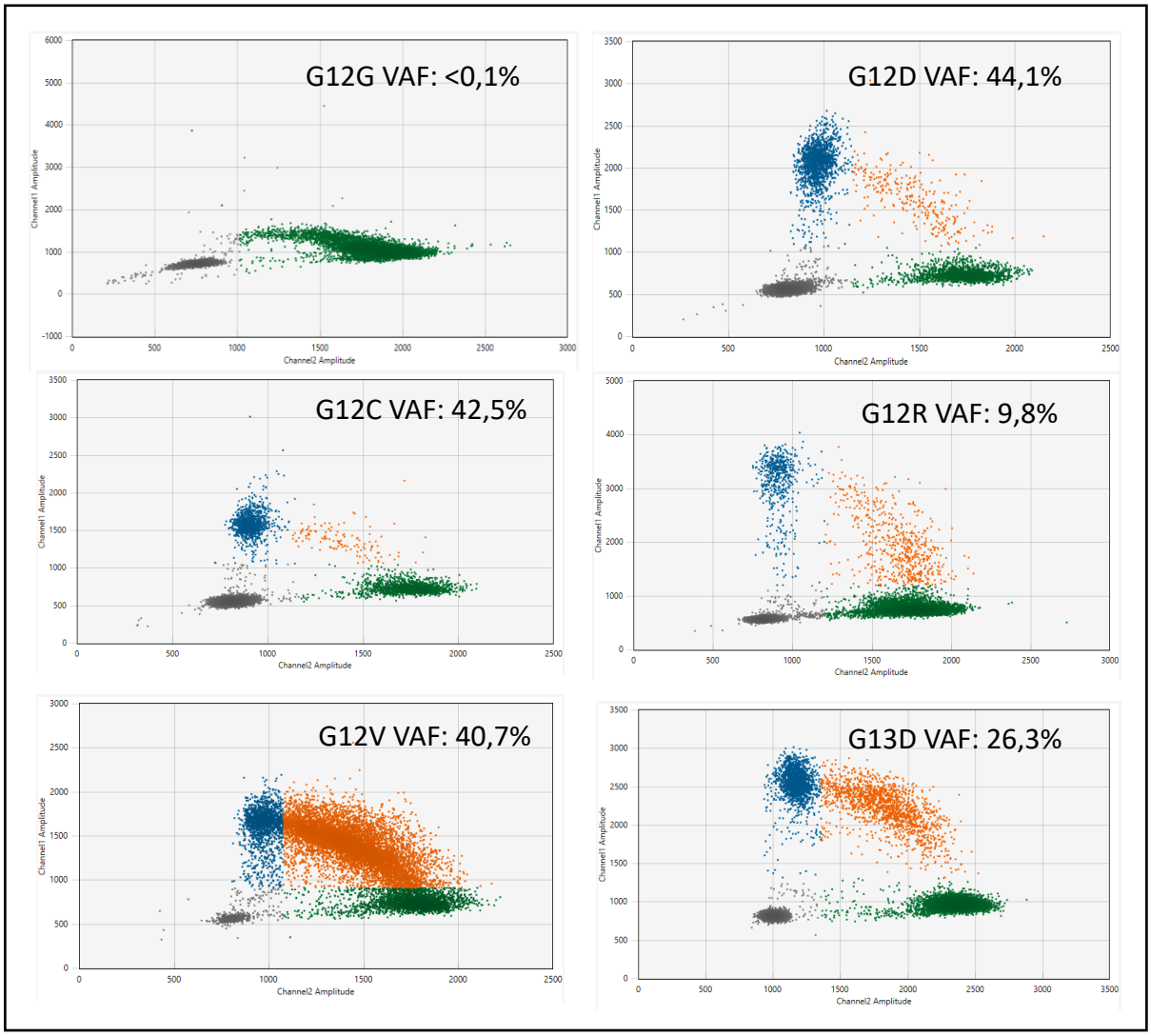


Figura 12. Verificación de la especificidad de las sondas marcadas para las mutaciones de KRAS mediante PCR digital. Gráficos de amplitud de fluorescencia en dos dimensiones obtenidos mediante PCR digital para el control negativo (G12G WT) y los controles positivos (de izquierda a derecha y de arriba abajo: G12D, G12C, G12R, G12V G13D). Cada punto corresponde a una gota individual clasificada según la fluorescencia detectada: FAM (mutado, azul), HEX (no mutado, verde), doble positivo (naranja) y negativo (gris)

Los resultados de VAF obtenidos en los controles positivos fueron del 44,1% para G12D, 40,7% para G12V, 9,8% para G12R, 26,3% para G13D y 42,5% para G12C. Los resultados muestran una alta concordancia con los valores previamente obtenidos mediante NGS, con excepción de la

variante G12R, que presentó una diferencia más marcada en la VAF. En el control WT, la señal en FAM fue inferior al 0,1%.

2.2. Evaluación de la sensibilidad analítica del ensayo multiplex de *KRAS*

La sensibilidad analítica del ensayo de PCR digital para la detección de mutaciones en *KRAS* se evaluó mediante el cálculo del límite del blanco (LB) y del límite de detección (LD), siguiendo el enfoque basado en la distribución de eventos falsos positivos descrito para PCR digital por Milbury et al. (180). El análisis se realizó a partir de los resultados obtenidos en cinco experimentos independientes a partir de muestras de ADN genómico con *KRAS* WT (G12G), realizados en condiciones experimentales equivalentes (tabla 6).

Tabla 6: Resultados obtenidos en los controles negativos de *KRAS* analizados en cinco series independientes

	KRAS G12D/V/R/C – 13D Eventos FAM	*KRAS* G12G Eventos HEX	Totales
Ensayo 1	1	4944	14121
Ensayo 2	2	9607	10807
Ensayo 3	0	5273	13110
Ensayo 4	2	6863	10594
Ensayo 5	5	6018	8581

El análisis de los controles negativos (1, 2, 0, 2 y 5 eventos FAM) permitió estimar una media de fondo de 2 eventos por reacción. Asumiendo una distribución de Poisson, se determinó que la probabilidad de observar 6 o más eventos en una muestra negativa era inferior al 5%: $P(X \geq 6 \mid \lambda = 2) \approx 0{,}0166$, por lo que se estableció un límite del blanco de 6 eventos.

A partir de este valor, el límite de detección se estimó como el número mínimo de eventos capaz de superar el LB con una probabilidad superior al 95%, obteniéndose un LD de 11 eventos positivos en el canal FAM.

Este umbral correspondió aproximadamente a una frecuencia alélica variante del 0,17% en las condiciones experimentales del ensayo.

3. Tercer objetivo: Evaluar el rendimiento diagnóstico de los métodos desarrollados, en términos de sensibilidad y especificidad, en un estudio clínico piloto para la detección de CCR y lesiones precursoras avanzadas

3.1. Características clínicas y demográficas de la población

Para este estudio se seleccionaron un total de 84 individuos, reclutados del programa de cribado poblacional de CCR (n = 52) y la consulta de PDTR (n = 32) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Se perdieron un total de 5 individuos en los que no se recogío la muestra de sangre para el análisis de cfDNA, por lo que la población final de estudio fue de 79 individuos. La distribución entre los grupos fue de 33 controles sanos o pólipos no adenomatosos, 15 individuos con AA y 2 con CCR de la población reclutada del programa de cribado de CCR y un total de 29 individuos diagnosticados de CCR de la cohorte derivada de la consulta de PDTR (figura 13).

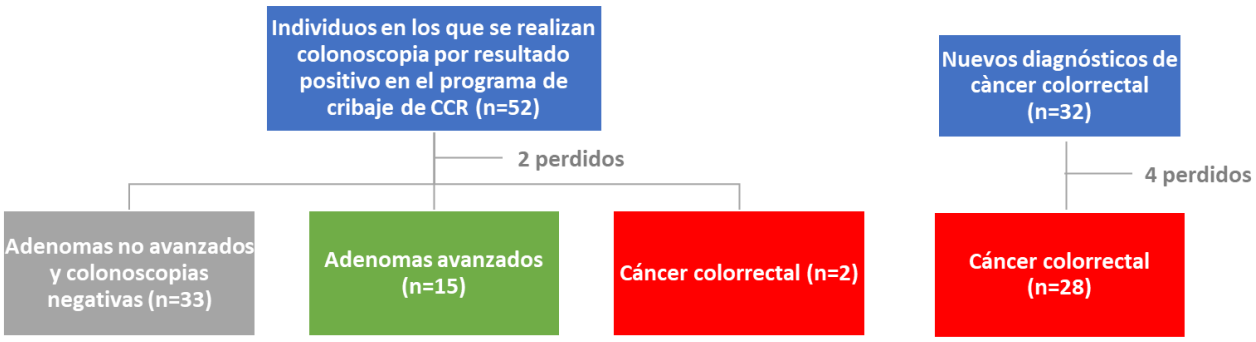


Figura 13. Distribución de las cohortes según hallazgos en colonoscopia y nuevos diagnósticos de CCR

Dado que en el análisis de tipo caso-control todos los pacientes se evalúan de forma conjunta, independientemente de su cohorte de procedencia, se agruparon los individuos para el análisis de los biomarcadores.

Tras la integración de los pacientes con CCR procedentes de ambas cohortes, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad entre los tres grupos de estudio. En concreto, las medianas de edad fueron superiores en los grupos con AA y CCR en comparación

con el grupo control (tabla 7). El análisis post hoc reveló que esta diferencia era atribuible principalmente a la comparación entre el grupo control y el grupo CCR (p = 0,004), y no se observaron diferencias significativas en la distribución por sexo entre los grupos (p = 0,515).

Tabla 7. Características demográficas de la población de estudio

	Control (n=33)	AA (n=15)	CCR (n=31)	Total (n=79)	*p valor*
Edad (años)					
Mediana (RI)	58 (54–62)	64 (57–66)	65 (58–68)	—	0,006*
Sexo, n (%)					
Hombres	21 (63,6%)	9 (60,0%)	16 (51,6%)	46 (58,2%)	0,515**
Mujeres	12 (36,4%)	6 (40,0%)	15 (48,4%)	33 (41,8%)	—

*Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de * Kruskal–Wallis y ** chi-cuadrado.*

RI, rango intercuartílico; AA: Adenomas avanzados; CCR: Cáncer colorrectal

Estas diferencias en la distribución de la edad son probablemente consecuencia de los criterios de inclusión del programa de cribado de CCR, que limita la participación a individuos de entre 50 y 69 años, frente a la ausencia de un límite de edad específico en el reclutamiento de pacientes procedentes de la consulta de PDTR.

En cuanto al sexo, la cohorte estuvo compuesta por 46 hombres (58,2%) y 33 mujeres (41,8%), sin observarse diferencias significativas en su distribución entre los tres grupos ($\chi^2(2) = 1,33$; p = 0,515).

Las características demográficas, clínicas y anatomopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio se presentan en las Tablas 8–11. Las tablas 8 y 9 recogen el análisis resumido de la cohorte procedente del programa de cribado y la de pacientes seleccionados con CCR, respectivamente.

Tabla 8. Resumen histopatológico de la cohorte procedente del programa de cribado de CCR.

Característica	NV (n = 33)	VE/VI (n = 15)	CCR (n = 2)
Hallazgos histológicos*			
Sin hallazgos relevantes	16 (48,5%)	0	0
Pólipo(s) hiperplásico(s)	9 (27,3%)	4 (26,7%)	0
Adenoma(s) tubular(es)	11 (33,3%)	12 (80,0%)	2 (100,0%)
Adenoma(s) tubulovelloso(s)	0	8 (53,3%)	0
Adenoma velloso	0	1 (6,7%)	0
Lesión(es) serrada(s)	2 (6,1%)	5 (33,3%)	0
Pólipo no valorable	1 (3,0%)	0	0
Adenocarcinoma	0	0	2 (100,0%)
Número de pólipos			
0–1	24 (72,7%)	3 (20,0%)	0
2–4	9 (27,3%)	4 (26,7%)	2 (100,0%)
≥5	0	8 (53,3%)	0
Tamaño máximo de lesión			
<10 mm	33 (100,0%)	3 (20,0%)	0
≥10 mm	0	12 (80,0%)	2 (100,0%)

** Los hallazgos histológicos no son mutuamente excluyentes, ya que algunos pacientes presentaron múltiples lesiones sincrónicas. NV, no vigilancia; VE/VI, vigilancia estándar o intensiva; CCR, cáncer colorectal*

Tabla 9. Características clinicopatológicas de la cohorte de pacientes con CCR reclutados en la Consulta de Diagnóstico y Tratamiento Rápido.

Característica	n = 32
Localización tumoral	
Colon derecho	14 (43,8%)
Colon izquierdo / sigma	9 (28,1%)
Colon transverso	3 (9,4%)
Recto	6 (18,8%)
Grado histológico	
Bajo grado	24 (75,0%)
Alto grado / moderadamente diferenciado / histología mixta	7 (21,9%)
No especificado	1 (3,1%)
Estadio clínico (cTNM/pTNM)	
I	10 (31,2%)
II	8 (25,0%)
III	10 (31,2%)
IV	4 (12,5%)

El estadio se asignó según información clínica y/o anatomopatológica disponible (cTNM/pTNM). CCR, cáncer colorrectal; cTNM, clasificación clínica TNM; pTNM, clasificación patológica TNM

Las tablas 10 y 11 muestran los datos individualizados para cada uno de los sujetos incluidos en el estudio.

Tabla 10. Resultados individualizados de la colonoscopia de la cohorte procedente del programa de cribado de CCR

ID	Hallazgos en colonoscopia/ Numero pólipos (tamaño en mm)	Estudio histológico*	Grupo
28	1 pólipo (20)	Adenoma tubular	Vigilancia estándar/intensiva
29	5 pólipos (9/6/6/1/3)	Adenoma tubulovelloso, 2 adenomas tubulares y pólipo hiperplásico	Vigilancia estándar/intensiva
30	1 pólipo (9)	Adenoma tubular	No vigilancia
31	Diverticulosis de sigma	NA	No vigilancia
32	1 pólipo (3)	Pólipo hiperplásico	No vigilancia
33	2 pólipos (2/4)	Pólipos hiperplásicos	No vigilancia
34	5 pólipos (4/6/3/11/2) y 5 lesiones serrades (16/9/9/1/1)	2 Adenoma tubulares, 2 adenomas tubulovellosos, un adenoma tubular y 5 lesiones 2 lesiones serradas	Vigilancia estándar/intensiva
35	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
36	3 pólipos (11/5/3)	Adenoma tubulovelloso y dos adenomas tubulares	Vigilancia estándar/intensiva
37	4 pólipos (3/3/5/5)	3 adenomas tubulares y pólipo hiperplásico	No vigilancia
38	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
39	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
40	2 pólipos (10/3)	Adenoma tubulovelloso de 10 mm y adenoma tubular de 3 mm	Vigilancia estándar/intensiva
41	8 pólipos (12/6/6/6/6/5/5/4)	8 adenomas tubulares	Vigilancia estándar/intensiva
42	11 pólipos (20/15/8/6/6/5/5/3/3/3)	11 Adenomas tubulares	Alto riesgo (vigilancia intensiva)
43	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
44	1 pólipo (4)	Pólipo hiperplásico	No vigilancia
45	1 pólipo (4)	Pólipo hiperplásico	No vigilancia
46	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
47	1 pólipo (3) y lesión serrada (7)	Adenoma tubular y lesión serrada	No vigilancia
48	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
49	2 pólipos (4/5) y cuatro lesiones serradas (10/10/4/6)	Adenoma tubular de 4 mm, pólipo hiperplásico de 5 mm, lesiones serradas (dos de 10 mm, 4 mm y 6 mm)	Vigilancia estándar/intensiva
50	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
51	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
52	3 pólipos (2/7/7)	Adenoma tubular y dos pólipos hiperplásicos	No vigilancia

ID	Hallazgos en colonoscopia/ Numero pólipos (tamaño en mm)	Estudio histológico*	Grupo
1	1 pólipo (6)	Adenoma tubular	No vigilancia
2	1 pólipo (9)	Adenoma tubular	No vigilancia
3	3 pólipos (6/18/12) y 3 lesiones serradas (5/5/5)	Adenoma tubular, adenoma velloso, 3 lesiones serrados	Vigilancia estándar/intensiva
5	5 pólipos (3/6/6) y lesión serrada (6)	Adenoma tubular, 2 pólipos hiperplásicos y lesión serrada	Vigilancia estándar/intensiva
6	3 pólipos (12/5/1)	Adenoma tubulovelloso, 2 adenomas tubulares	Vigilancia estándar/intensiva
7	2 pólipos (3/4 mm)	Pólipos hiperplásicos	No vigilancia
8	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
9	2 pólipos (3)	Adenoma tubular y pólipo hiperplásico	No vigilancia
10	2 pólipos (4/7)	Adenomas tubulares	No vigilancia
11	4 pólipos (25/5/10/6)	Adenoma tubulovelloso, 2 lesiones serradas sésiles y pólipo hiperplásico	Vigilancia estándar/intensiva
12	1 pólipo (11)	Adenoma tubulovelloso	Vigilancia estándar/intensiva
13	1 pólipo (15)	Adenoma tubulovelloso	Vigilancia estándar/intensiva
14	1 pólipo (5)	Adenoma tubular	No vigilancia
15	1 pólipo (4)	Adenoma tubular	No vigilancia
16	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
17	Lesión proliferativa exofítica, ulcerada, infiltrativa en sigma (25) y un pólipo (4)	Adenoarcinoma (pT2N0), Adenoma tubular	CCR
18	2 pólipos (9/-)	Pólipo hiperplásico y pólipo no valorable	No vigilancia
19	6 pólipos (6/4/4/4/2/2)	6 adenomas tubulares	Vigilancia estándar/intensiva
20	Hemorroides internas	NA	No vigilancia
21	Lesión polipoidea de aspecto infiltrativo (15) y dos pólipos (3/3)	Adenocarcinoma (pT1N0), 2 adenomas tubulares de 3 mm	CCR
23	2 pólipos (2/3) y lesión serrada (5)	2 adenomas tubulares y lesión serrada	No vigilancia
24	Úlcera colónica	NA	No vigilancia
25	Hemorroides internas, colitis leve	NA	No vigilancia
26	Diverticulosis	NA	No vigilancia
27	Hemorroides internas y externas	NA	No vigilancia

** Estudio histológico de los fragmentos obtenidos durante la colonoscopia y analizados en el Servicio de* Anatomía Patológica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. NA. No aplica

Tabla 11. Características clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con CCR

ID	Edad (años)	Sexo	Diagnostico	Localización tumoral	Diagnóstico histológico de lesiones y otros hallazgos significativos	Tamaño tumor primario	Estadio (cTNM/pTNM)
NEO 1	69	H	Anemia y perdida de peso	Colon izquierdo	Adenocarcinoma infiltrante de bajo grado. Carcinomatosis peritoneal y múltiples M1 pulmonares, adenopatías subcarinales y hiliares bilaterales	8 cm	Estadio IVC (cT4N1M1)
NEO 2	51	H	Rectorragia	Colon transverso	Adenocarcinoma infiltrante de bajo grado.	5 x 3 x 0,8 cm	Estadio IIA (pT3N0M0)
NEO 3	56	H	Rectorragia	Recto	Adenocarcinoma infiltrante de bajo grado.	2 x 1 x 0,5 cm	Estadio I (cT2N0)
NEO 4	57	H	Anemia	Colon derecho	Carcinoma poco diferenciado	1.1 x 1 cm	Estadio III (cT3N2bM0)
NEO 5	65	H	Anemia	Recto	Adenocarcinoma infiltrante de bajo grado. 2/4 de la circunferencia	2,5 x 2,5 x 1,5 cm	Estadio IIIB (pT4aN1bM0)
NEO 6	45	M	Rectorragia	Colon derecho	Adenocarcinoma infiltrante moderadamente diferenciado (G2)	8 x 5 x 1.6cm	Estadio III (T3N1a)
NEO 7	59	H	Incidental: TAC abdominal	Colon izquierdo	Adenocarcinoma infiltrante de alto grado.	4,8 x 3,2 x 3,1 cm	Estadio III – (pT4N2M0)
NEO 8	63	M	Programa de cribado	Colon transverso	Adenocarcinoma infiltrante de alto grado	2,8 x 2 x 0,6 cm	Estadio IIB (pT4aN0)
NEO 9	66	M	Programa de cribado	Recto	Adenocarcinoma infiltrante de bajo grado	1,5 x 1 cm	Estadio I (pT1Nx)
NEO 10	69	M	Anemia	Colon derecho	ADK infiltrante de bajo grado. adenopatías infiltrativas locorregionales y múltiples metástasis hepáticas	6,5 x 4,3 cm	Estadio IV
NEO 11	67	M	Programa de cribado	Sigma	Adenocarcinoma de bajo grado	1 x 1 x 0,3 cm	Estadio I (pT2N0M0)
NEO 12	64	M	Programa de cribado	Colon derecho	Adenocarcinoma de bajo grado	0.4 x 0.2 cm	Estadio I
NEO 13	90	M	Anemia y sangre oculta en heces positiva	Colon derecho	Adenocarcinoma infiltrante de alto grado mal diferenciado con células en anillo de sello	3,5 x 2 cm	Estadio IIIA (pT2N1a)
NEO 14	76	M	Anemia y sangre oculta en heces positiva	Colon derecho	Adenocarcinoma de bajo grado	3,2 x 3,2 x 1,2 cm	Estadio IIA (pT3N0)
NEO 15	74	M	Anemia	Sigma	Adenocarcinoma de bajo grado	3,2 x 2,4 x 1,1 cm	Estadio II (pT3N0)

Tabla 11 (continuación). Características clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con CCR

ID	Edad (años)	Sexo	Diagnostico	Localización tumoral	Diagnóstico histológico de lesiones y otros hallazgos significativos	Tamaño tumor primario	Estadio (cTNM/pTNM)
NEO 16	77	H	Rectorragias	Recto	Adenocarcinoma de bajo grado	1,8 x 1,3 x 0,7 cm	Estadio II (pT3N0)
NEO 17	83	M	Anemia	Colon derecho	Adenocarcinoma de bajo grado	3 x 2,8 x 0,6 cm	Estadio I (pT1N0)
NEO 18	64	H	Rectorragia y dolor abdominal	Recto	Adenocarcinoma de alto grado	3.1 cm	Estadio IVB (T3d N2a cM1b)
NEO 19	63	H	Anemia	Colon trasverso proximal	Adenocarcinoma de bajo grado	14 cm	Estadio IIIB (pT3N1a)
NEO 20	59	H	Programa de cribado	Sigma	Adenocarcinoma superficial de bajo grado	1.4 x 1,1 x 1 cm	Estadio I (pTisN0)
NEO 21	52	M	Rectorragias	Sigma	Adenocarcinoma de bajo grado (oligometas)	5,7 x 3,4 x 1 cm	Estadio IV (pT3pN0M1)
NEO 22	83	M	Diarreas y sangre oculta en heces positiva	Sigma	Carcinoma neuroendocrino de alto grado de célula grande (70%) y Adenocarcinoma de bajo grado (30%)	7,2 x 5,4 x 4,3 cm	Estadio IIIC (pT4bN1a)
NEO 23	70	M	Anemia y sangre oculta en heces positiva	Derecho	Adenocarcinoma de bajo grado	0,7 x 0,5 cm	Estadio IIIC (cT3-T4N2M0)
NEO 24	60	H	Rectorragias	Sigma	Adenocarcinoma infiltrante de tipo intestinal de bajo grado	3,5 x 3 x 1 cm	Estadio IIIB (pT3aN2a)
NEO 25	58	H	Cambio ritmo deposicional y antecedentes familiares	Recto	Adenocarcinoma infiltrante de tipo intestinal	2,7x2,7x2,7 CM.	Estadio I (cT2N0)
NEO 26	61	H	Anemia y sangre oculta en heces positiva	Colon trasverso proximal	Adenocarcinoma infiltrante de bajo grado	0.8 x 0.14cm	Estadio I (cT2N0)
NEO 27	67	H	Cambio en ritmo deposicional	Derecho distal	Adenocarcinoma infiltrante de bajo grado	3.2 cm	Estadio II (pT3N0)
NEO 28	65	H	Programa de cribado	Colon trasverso	Adenocarcinoma no especificado ulcerado	4.5 x 3 x 0,7 cm	Estadio II (pT3N0)
NEO 29	69	M	Programa de cribado	Colon ascendente	Adenocarcinoma infiltrante de bajo grado	2.6 cm	Estadio I (pT2N0)
NEO 30	65	H	Anemia	Derecho-Ciego	adenocarcinoma infiltrante de bajo grado	3,7 x 2,9 cm	Estadio IIA (pT3N0)
NEO 31	36	H	rectorragias y mucosidad en las heces	Sigma	adenocarcinoma infiltrante de bajo grado	7 x 5 x 0,7 cm	Estadio IIIB (pT3N1b)
NEO 32	75	M	AF i TSOF+	Colon derecho	adenocarcinoma infiltrante de bajo grado	1,2 cm	Estadio I (pT1N0)

Población de estudio para el análisis de marcadores epigenéticos en cfDNA

El estudio de los marcadores epigenéticos se llevó a cabo en una cohorte compuesta por los sujetos con muestras de plasma evaluables bajo las condiciones optimizadas del ensayo. En total, se incluyeron 69 individuos, de los cuales 26 correspondían a sujetos con colonoscopia normal o con pólipos no adenomatosos analizados como grupo control (ID: 1, 2, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 20, 23, 25, 27, 30, 31, 32, 35, 37, 38, 43, 44, 45, 46, 47, 50 y 52), 12 con AA (ID: 3, 5, 6, 13, 19, 28, 29, 36, 40, 41, 42, 49) y 31 individuos con CCR (ID: 17, 21, NEO-1, NEO-2, NEO-3, NEO-4, NEO-5, NEO-6, NEO-7, NEO-8, NEO-10, NEO-11, NEO-12, NEO-13, NEO-14, NEO-15, NEO-16, NEO-17, NEO-19, NEO-20, NEO-21, NEO-22, NEO-23, NEO-24, NEO-25, NEO-26, NEO-27, NEO-28, NEO-29, NEO-30 y NEO-31).

3.2. Población de estudio para el análisis de mutaciones de *KRAS* en cfDNA

El análisis de *KRAS* se llevó a cabo en un total de 42 individuos, que correspondían a aquellos sujetos del estudio para los que se disponía de volumen de plasma adicional para la realización de este ensayo, una vez realizado el estudio previo en cfDNA de los marcadores de metilación. El grupo de controles estuvo constituido por 16 individuos con colonoscopia negativa (ID: 14, 15, 16, 20, 23, 25, 27, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 38, 39, 45, 46, 48 y 50). El grupo de AA estuvo formado únimcamente por 2 individuos, correspondientes a los sujetos 13 y 28. Finalmente, el grupo de neoplasias colorrectales incluyó 24 pacientes, identificados por las ID: NEO-2, NEO-3, NEO-4, NEO-6, NEO-11, NEO-12, NEO-13, NEO-14, NEO-15, NEO-16, NEO-17, NEO-19, NEO-20, NEO-21, NEO-22, NEO-23, NEO-24, NEO-25, NEO-26, NEO-27, NEO-28, NEO-29, NEO-30 y NEO-31.

3.3. Comparación de la concentración de cfDNA entre grupos clínicos

Se evaluó la concentración de cfDNA previa al análisis de los marcadores epigenéticos. Los resultados se presentan en la en la tabla 12.

Tabla 12: Comparación de la concentración de cfDNA entre grupos diagnósticos

Grupo	Mediana [P25–P75]
Controles	0,59 [0,39–0,98]
AA	0,86 [0,69–1,11]
NA	1,12 [0,83–1,75]
CCR	1,28 [0,86–2,41]
CCR I/II	1,13 [0,86–1,68]
CCR III/IV	1,57 [0,94–2,88]

AA: adenoma avanzado; NA: neoplasia avanzada (AA+CCR); CCR: cáncer colorrectal; CCR I/II: CCR estadios iniciales; CCR III/IV: CCR estadios avanzados

La concentración de cfDNA fue ligeramente superior en los AA (mediana 0,86 ng/µL; RI 0,69–1,11) en comparación con los controles (mediana 0,59 ng/µL; RI 0,39–0,98), sin alcanzar la significación estadística ($p = 0,051$).

En los individuos con CCR, la concentración de cfDNA fue significativamente superior a la observada en los controles (mediana 1,28 ng/µL; RI 0,86–2,41 vs. 0,59 ng/µL; RI 0,39–0,98; $p < 0,001$). Esta diferencia se mantuvo tanto en los estadios iniciales (I–II) (mediana 1,13 ng/µL; RI 0,86–1,68; $p < 0,001$) como en los estadios avanzados (mediana 1,57 ng/µL; RI 0,94–2,88; $p < 0,001$).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los estadios iniciales y avanzados del CCR ($p = 0,254$).

Finalmente, el grupo de NA (AA + CCR) presentó valores superiores de cfDNA en comparación con los controles (mediana 1,12 ng/µL; RI 0,83–1,75), sin alcanzar significación estadística ($p = 0,051$).

3.4. Sensibilidad y especificidad del análisis de biomarcadores epigenéticos

Los resultados obtenidos con la versión optimizada del método de ddPCR para cada una de los sujetos analizados se muestran en la tabla 13. A partir de los datos obtenidos, en los posteriores apartados se muestran los rendimientos diagnósticos en cuanto a sensibilidad y especificidad de cada uno de los marcadores de metilación para la detección de AA y CCR. Los VPP y VPN se calcularon únicamente para el conjunto del panel completo de metilación y fueron ajustados a la prevalencia de la enfermedad en la población entre 50-69 años derivada del programa de detección precoz de CCR por sangre oculta en heces positiva.

Tabla 13. Resultados de concentración de cfDNA y positividad para los marcadores de metilación

ID	Grupo	[cfDNA] (ng/ul)	*SEPT9* % (eventos FAM)	*EYA4* % (eventos FAM)	*SDC2* % (eventos FAM)	*ITGA4* % (eventos FAM)	*MAP3K14-AS1* % (eventos FAM)	*PRIMA1* % (eventos FAM)
1	NV	1,53	<LD	<LD	0,18 (7)	<LD	<LD	<LD
2	NV	0,68	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
3	AA	0,63	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1 (5)
5	AA	0,72	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
6	AA	0,68	<LD	1,28 (4)	<LD	<LD	<LD	<LD
7	NV	1,15	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
8	NV	1,28	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
9	NV	0,51	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
10	NV	0,84	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
13	AA	0,93	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
14	NV	0,45	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
15	NV	0,57	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
16	NV	0,39	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
17	CCR I-II	1,28	<LD	0,50 (4)	<LD	<LD	<LD	0,61 (4)
19	AA	1,75	<LD	0,33 (3)	<LD	0,39 (8)	<LD	0,46 (5)
20	NV	1,57	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,97 (12)
21	CCR I-II	0,76	-	<LD	<LD	1,47 (6)	<LD	<LD
27	NV	0,39	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1,89 (5)
28	AA	0,43	-	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
29	AA	0,89	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
30	NV	0,43	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
31	NV	0,70	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
32	NV	0,72	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
35	NV	0,32	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
36	AA	0,75	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,72 (4)
37	NV	0,44	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
38	NV	0,52	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
39	NV	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
40	AA	1,04	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,99 (3)
41	AA	0,83	<LD	1,05 (4)	<LD	<LD	<LD	2,4 (6)
42	AA	1,31	<LD	0,54 (6)	<LD	0,75 (7)	<LD	1,14 (10)
43	NV	0,92	<LD	1,74 (4)	<LD	<LD	<LD	<LD
44	NV	0,61	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,46 (6)
45	NV	0,25	<LD	<LD	1,19 (4)	<LD	<LD	<LD
46	NV	0,14	<LD	4,7 (3)	<LD	<LD	<LD	<LD
47	NV	2,11	1 (4)	0,96 (4)	<LD	<LD	<LD	<LD
48	NV	1,50	NA	NA	NA	NA	NA	NA
49	AA	1,13	<LD	0,69 (3)	<LD	<LD	<LD	<LD
50	NV	1,22	<LD	0,9 (4)	<LD	<LD	<LD	<LD
52	NV	0,63	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-1	CCR III-IV	8,07	2,68 (44)	4,1 (62)	2,63 (188)	3,42 (142)	4,4 (126)	1,82 (39)
N-2	CCR I-II	0,70	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-3	CCR I-II	1,64	<LD	0,76 (4)	0,39 (11)	<LD	<LD	<LD
N-4	CCR III-IV	1,02	<LD	<LD	0,6 (16)	0,31 (5)	<LD	0,65 (6)
N-5	CCR III-IV	1,38	<LD	0,56 (5)	0,14 (5)	0,26 (5)	<LD	0,45 (5)
N-6	CCR III-IV	1,35	<LD	<LD	0,22 (5)	<LD	<LD	0,39 (3)
N-7	CCR III-IV	0,66	<LD	2,41 (6)	8,65 (36)	<LD	<LD	9,09 (8)
N-8	CCR I-II	0,97	<LD	0,5 (4)	<LD	<LD	<LD	0,9 (8)
N-10	CCR III-IV	0,85	6,31 (28)	54 (303)	41 (783)	41 (421)	49 (275)	15 (94)

ID	Grupo	[cfDNA] (ng/ul)	*SEPT9* % (eventos FAM)	*EYA4* % (eventos FAM)	*SDC2* % (eventos FAM)	*ITGA4* % (eventos FAM)	*MAP3K14-AS1* % (eventos FAM)	*PRIMA1* % (eventos FAM)
N-11	CCR I-II	1,60	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-12	CCR I-II	0,48	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-13	CCR III-IV	2,59	<LD	1,37 (16)	0,14 (4)	0,91 (12)	3,08 (12)	0,91 (9)
N-14	CCR I-II	1,27	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-15	CCR I-II	1,81	<LD	<LD	<LD	0,34 (5)	<LD	0,38 (3)
N-16	CCR I-II	0,86	<LD	1,07 (3)	1,62 (15)	<LD	<LD	<LD
N-17	CCR I-II	0,85	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-19	CCR III-IV	2,41	9,03 (33)	3,45 (25)	5,49 (114)	4,8 (50)	12,1 (49)	6,72 (50)
N-20	CCR I-II	3,28	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,35 (3)
N-21	CCR III-IV	3,16	<LD	0,48 (3)	<LD	<LD	<LD	<LD
N-22	CCR III-IV	3,46	43,8 (129)	19,3 (198)	25,2 (573)	28,6 (352)	36,5 (146)	22,1 (121)
N-23	CCR III-IV	1,93	<LD	0,52 (3)	<LD	<LD	<LD	<LD
N-24	CCR III-IV	1,57	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,55 (4)
N-25	CCR I-II	1,12	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-26	CCR I-II	2,61	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,81 (10)
N-27	CCR I-II	0,89	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,59 (3)
N-28	CCR I-II	1,08	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,63 (3)
N-29	CCR I-II	2,96	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-30	CCR I-II	1,13	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1,49 (7)
N-31	CCR III-IV	0,45	<LD	<LD	1,26 (9)	<LD	<LD	<LD

Los valores entre paréntesis indican el número absoluto de eventos FAM detectados. <LD indica valores por debajo del límite de detección del ensayo. NV: No vigilancia; AA: Adenomas avanzados; CCR I-II: Cáncer colorectal en estadios iniciales; CCR III-IV: Cáncer colorrectal en estadios avanzados; NA: No analizado

3.4.1. Rendimiento diagnóstico del panel de metilación para la detección de adenomas avanzados

En la Tabla 14 se muestran los parámetros de rendimiento diagnóstico de los distintos biomarcadores para la detección de AA.

El biomarcador *SEPT9* únicamente se detectó en un caso del grupo control y no se observaron casos positivos entre los pacientes con AA. La sensibilidad de *EYA4* para la detección de AA alcanzó un 41,7% (5/12) y una especificidad del 88,5% (23/26).

La tasa de positividad del biomarcador *SDC2* en el grupo control fue de un 7,7% (2/26) y no se detectaron casos positivos en el grupo de AA. *ITGA4* mostró dos casos positivos entre los pacientes con AA y una especificidad del 100% (26/26).

El biomarcador MAP3K14_AS1 no resultó informativo en esta cohorte, al no detectarse señal positiva en ninguno de los casos analizados, tanto en controles como en pacientes con AA.

PRIMA1 mostró una sensibilidad para la detección de AA del 50,0% (6/12) y una especificidad del 84,6% (23/26).

La combinación de biomarcadores permitió modificar el rendimiento diagnóstico global. El modelo basado en la positividad de al menos un biomarcador mostró una sensibilidad del 66,7% (8/12) y una especificidad del 69,2% (18/26). Por su parte, el modelo basado en la positividad de al menos dos biomarcadores mostró una sensibilidad del 25,0% (3/12) y una especificidad del 96,2% (25/26).

Tabla 14. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de AA

Biomarcador	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
SEPT9	0,0	96,0	0,0	66,7
EYA4	41,7	88,5	62,5	76,7
SDC2	0,0	92,3	0,0	66,7
ITGA4	16,7	100,0	100,0	72,2
MAP3K14-AS1	0,0	100,0	NC	68,4
PRIMA1	50,0	84,6	60,0	78,6
Panel ≥1 marcador	66,7	69,2	50	81.8
Panel ≥2 marcadores	25,0	96,2	75,0	73.5

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo. NC: No calculable

3.4.2. Rendimiento diagnóstico del panel de metilación para la detección de cáncer colorrectal

En la tabla 15 se muestran los parámetros de rendimiento diagnóstico de los distintos biomarcadores para la detección de CCR.

El biomarcador *SEPT9* fue positivo en el 13,3% (4/30) de los pacientes con CCR y únicamente se detectó un caso positivo en el grupo control. *MAP3K14-AS1* e *ITGA4* presentaron sensibilidades del 16,1 % (5/31) y del 29,0 % (9/31), respectivamente.

Los biomarcadores *EYA4* y *SDC2* mostraron sensibilidades del 41,9% (13/31) y 38,7% (12/31), respectivamente. *PRIMA1* alcanzó la mayor sensibilidad, con un 45,2% (14/31).

El modelo basado en la positividad de al menos un biomarcador mostró una sensibilidad del 74,2% (23/31), frente al 38,7 % (12/31) obtenido con el criterio de al menos dos biomarcadores positivos.

Tabla 15. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de CCR

Biomarcador	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
SEPT9	13,3	96,0	80,0	48,0
EYA4	41,9	88,5	81,3	56,1
SDC2	38,7	92,3	85,7	55,8
ITGA4	29,0	100,0	100,0	54,2
MAP3K14-AS1	16,1	100,0	100,0	50,0
PRIMA1	45,2	84,6	77,8	56,4
Panel ≥1 marcador	74,2	69,2	74,2	69,2
Panel ≥2 marcadores	38,7	96,2	92,3	56,8

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

3.4.3. Rendimiento diagnóstico del panel de metilación para la detección de neoplasia avanzada

En la Tabla 16 se muestra el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de NA.

SEPT9 presentó una tasa de positividad del 9,5% (4/42) y no mostró una capacidad relevante para la detección de NA en esta cohorte, en consonancia con los resultados observados en el análisis de CCR. *EYA4* y *PRIMA1* fueron los biomarcadores individuales con mejor rendimiento. Ambos mostraron una mayor tasa de detección en pacientes con NA en comparación con los controles, con sensibilidades del 41,9% (18/43) y 46,5% (20/43), respectivamente. *SDC2* mostró una sensibilidad del 27,9% (12/43) y los marcadores de *ITGA4* y MAP3K14_AS1 no mostraron positividad en el grupo control y presentaron sensibilidades bajas en NA, con un 25,6% (11/43) y 11,6% (5/43), respectivamente.

El panel combinado alcanzó una sensibilidad del 72,1% (31/43) para el modelo basado en la positividad de al menos un biomarcador, y del 34,9% (15/43) para el modelo basado en la positividad de al menos dos biomarcadores.

Tabla 16. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de NA

Biomarcador	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
SEPT9	9,5	96,0	80,0	38,7
EYA4	41,9	88,5	85,7	47,9
SDC2	27,9	92,3	85,7	43,6
ITGA4	25,6	100,0	100,0	44,8
MAP3K14-AS1	11,6	100,0	100,0	40,6
PRIMA1	46,5	84,6	83,3	48,9
Panel ≥1 marcador	72,1	69,2	79,5	60,0
Panel ≥2 marcadores	34,9	96,2	93,8	47,2

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

3.4.4. Rendimiento diagnóstico del panel de metilación para la detección de cáncer colorrectal en estadios iniciales y avanzados

Los valores de sensibilidad de los biomarcadores individuales y del panel combinado según el estadio del CCR se muestran en la Tabla 17.

SEPT9 no mostró positividad en los casos de CCR en estadios iniciales. En estadios avanzados, en cambio, presentó una sensibilidad del 30,8% (4/13). *EYA4* mostró una sensibilidad del 22,2% (4/18) para la detección de CCR en estadios iniciales y del 69,2% (9/13) en estadios avanzados. *SDC2* presentó una sensibilidad del 11,1% (2/18) en estadios iniciales y del 76,9% (10/13) en estadios avanzados. *ITGA4* mostró una sensibilidad del 11,1% (2/18) en estadios iniciales y del 53,8% (7/13) en estadios avanzados. *MAP3K14-AS1* no presentó positividad en los casos de CCR en estadios iniciales y mostró una sensibilidad del 38,5% (5/13) en estadios avanzados. *PRIMA1* mostró una sensibilidad del 38,9% (7/18) en estadios iniciales y del 53,8% (7/13) en estadios avanzados.

El panel combinado basado en la positividad de al menos un biomarcador mostró una sensibilidad del 55,6% (10/18) en estadios iniciales y del 100% (13/13) en estadios avanzados. El modelo basado en la positividad de al menos dos biomarcadores mostró sensibilidades del 22,2% (4/18) y del 61,5% (8/13), respectivamente.

Tabla 17. Sensibilidad de biomarcadores y paneles según estadio de CCR

Biomarcador	CCR inicial (I–II) (%)	CCR avanzado (III–IV) (%)
SEPT9	0,0	30,8
EYA4	22,2	69,2
SDC2	11,1	76,9
ITGA4	11,1	53,8
MAP3K14-AS1	0,0	38,5
PRIMA1	38,9	53,8
Panel ≥1 marcador	55,6	100,0
Panel ≥2 marcadores	22,2	61,5

De forma global, las sensibilidades observadas para los biomarcadores individuales fueron inferiores en los estadios iniciales (I–II) en comparación con los estadios avanzados (III–IV). La sensibilidad aumentó al aplicar el modelo basado en la positividad de al menos un biomarcador, especialmente en los estadios avanzados.

3.4.5. Valores predictivos ajustados por prevalencia

Dado que los valores predictivos dependen de la prevalencia de la enfermedad, se realizó un ajuste basado en estimaciones de la población con resultados positivos de SOH derivadas de programas de cribado, con el objetivo de obtener una aproximación más realista del rendimiento clínico del ensayo y corregir el sesgo derivado de la composición de la cohorte.

En poblaciones con FIT positivo, utilizando un punto de corte de 20 µg Hb/g, la prevalencia de CCR se sitúa en torno al 3–5%. Para AA, la prevalencia alcanza aproximadamente el 25–35%, con una prevalencia global de NA cercana al 30–40% (83).

En base a estas estimaciones, se calcularon los VPP y VPN del panel de biomarcadores, considerando prevalencias del 30% para AA, del 4% para CCR y del 34% para NA (tabla 18).

Tabla 18. Valores predictivos del panel de biomarcadores ajustados por la prevalencia en individuos con SOH positivo derivados de programas de cribado

Grupo	Modelo	VPP (%)	VPN (%)
AA	≥1 biomarcador	48,2	82,9
AA	≥2 biomarcadores	74,1	75,0
CCR	≥1 biomarcador	9,1	98,5
CCR	≥2 biomarcadores	28,7	97,4
NA	≥1 biomarcador	54,7	82,8
NA	≥2 biomarcadores	83,9	73,9

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; AA: Adenomas avanzados; CCR: Cáncer colorrectal; NA: Neoplasia avanzada

3.4.6. Evaluación de puntos de corte alternativos para los marcadores epigenéticos en plasma

El LD analítico se estableció durante la fase de optimización como criterio principal de positividad del ensayo y se mantuvo en los análisis posteriores para preservar un umbral predefinido de detectabilidad. Debido a que este criterio se basa en la sensibilidad analítica del método y no necesariamente en su rendimiento discriminativo clínico, se llevó a cabo un análisis exploratorio de puntos de corte alternativos basados en el porcentaje de metilación. Este análisis tuvo como objetivo identificar umbrales potencialmente más adecuados para mejorar la especificidad del ensayo.

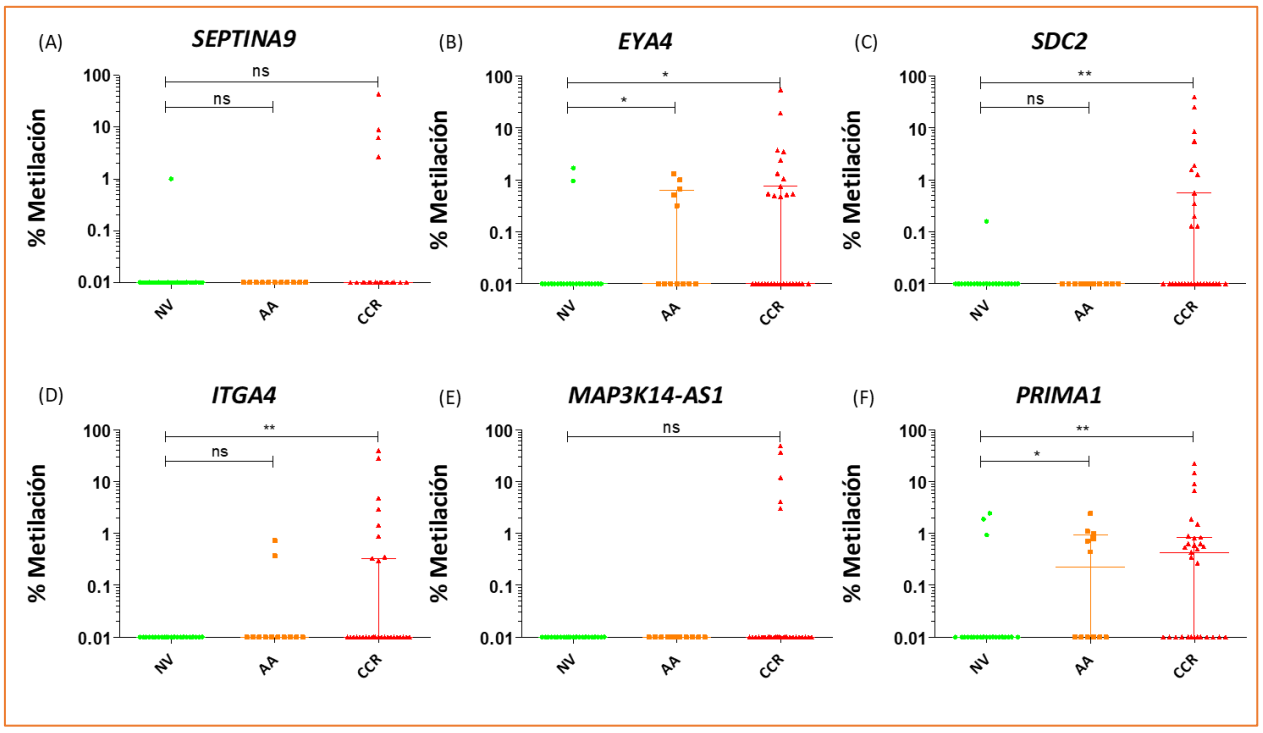


*Figura 14. Distribución de los porcentajes de metilación de los biomarcadores epigenéticos (A) SEPT9, (B) EYA4, (C) SDC2, (D) ITGA4, (E) MAP3K14-AS1 y (F) PRIMA1 en cfDNA de muestras de plasma de individuos con colonoscopia normal (NV), adenomas avanzados (AA) y cáncer colorrectal (CCR). Los resultados se expresan como porcentaje de ADN metilado (%M) en escala logarítimica. Los valores inferiores al límite de detección se representaron como 0,01 únicamente para su visualización. Cada punto representa una muestra individual; la línea horizontal indica la mediana y las líneas verticales representan el rango intercuartílico. Test de Mann–Whitney (NV vs AA y NV vs CCR); ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$*

En la figura 14 se muestran los porcentajes de metilación para cada uno de los biomarcadores analizados, junto con las comparaciones pareadas entre los grupos NV frente a AA y NV frente a CCR. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre NV y CCR para la mayoría de los biomarcadores (*EYA4*, *SDC2*, *ITGA4* y *PRIMA1*). En el caso de los AA estas diferencias fueron menos pronunciadas y limitadas únicamente a *EYA4* y *PRIMA1*.

Para optimizar el rendimiento diagnóstico del ensayo y mejorar su especificidad para la detección de NA, se realizó un análisis mediante curvas ROC para cada biomarcador.

A partir de este análisis, se seleccionaron puntos de corte alternativos basados en el porcentaje de metilación, definidos por el menor valor que permitía alcanzar una especificidad de al menos el 90%. En el caso del biomarcador *SEPT9*, se seleccionó un punto de corte superior, ya que permitía alcanzar una especificidad del 100% sin pérdida adicional de sensibilidad. Utilizando estos puntos de corte, se evaluaron los parámetros de rendimiento diagnóstico de cada biomarcador (tabla 19).

Tabla 19. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de NA con puntos de corte alternativos de metilación

Biomarcador	Punto de corte (%M)	AUC	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
SEPT9	1,84	0,53	9,8	100	100	39,3
EYA4	0,16	0,66	21,9	95,2	87,5	44,4
SDC2	0,065	0,62	27,9	95,5	92,3	40,4
ITGA4	0,15	0,63	25,6	100	100	40,7
MAP3K14-AS1	1,52	0,56	11,6	100	100	36,7
PRIMA1	0,96	0,69	20,9	90,9	81,8	37,0
Panel ≥1 marcador	-	-	46,5	81,8	83,3	43,9
Panel ≥2 marcadores	-	-	20,9	100	100	39,3

AUC: área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo. Para los modelos combinados (panel ≥1 y ≥2 marcadores), no se estimó el AUC al tratarse de variables categóricas basadas en criterios de positividad predefinidos

SEPT9, *ITGA4* y *MAP3K14-AS1* alcanzaron especificidades de hasta el 100%, aunque sus sensibilidades fueron bajas, con valores entre el 9,8 % y el 27,9 %. Los valores de VPN fueron inferiores al 45 % en todos los biomarcadores.

Por último, se evaluó el rendimiento del panel combinado de biomarcadores. El criterio basado en al menos un biomarcador positivo permitió incrementar la sensibilidad hasta el 46,5%, a expensas de una reducción en la especificidad (81,8%), con un VPP del 83,3% y un VPN del 43,9%. El criterio más restrictivo, basado en la positividad de al menos dos biomarcadores permitió alcanzar una especificidad del 100% y un valor predictivo positivo del 100%, aunque con una sensibilidad baja (20,9%) y un VPN del 39,3%.

Al restringir el análisis a pacientes con CCR (tabla 20), se observó una mejora en el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores, principalmente a expensas de un incremento de la sensibilidad diagnóstica.

Tabla 20. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores para la detección de CCR con puntos de corte alternativos de metilación

Biomarcador	Punto de corte (%M)	AUC	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
SEPT9	1,84	0,53	13,3	100	100	48,0
EYA4	0,16	0,66	25,0	95,2	85,7	52,6
SDC2	0,065	0,62	38,7	95,5	92,3	52,5
ITGA4	0,15	0,63	29,0	100	100	50,0
MAP3K14-AS1	1,52	0,56	16,1	100	100	45,8
PRIMA1	0,96	0,69	19,4	90,9	75,0	44,4
Panel ≥1 marcador	-	-	48,4	81,8	78,9	52,9
Panel ≥2 marcadores	-	-	25,8	100	100	48,9

AUC: área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo. Para los modelos combinados (panel ≥1 y ≥2 marcadores), no se estimó el AUC al tratarse de variables categóricas basadas en criterios de positividad predefinidos

3.4.7. Comparación de rendimientos analiticos basados en límite de detección y puntos de corte

La comparación entre el criterio basado en el LD y los puntos de corte optimizados mostró diferencias en el rendimiento diagnóstico del panel combinado para la detección de NA.

El modelo basado en la positividad de al menos un biomarcador (panel ≥1) alcanzó una sensibilidad del 72,1% utilizando el criterio de LD, con una especificidad del 69,2%. Al aplicar puntos de corte optimizados, la sensibilidad se redujo al 46,5%, con un aumento de la especificidad hasta el 81,8 %.

En el modelo más restrictivo (panel ≥2 biomarcadores), el criterio basado en el LD mostró una sensibilidad del 34,9% y una especificidad del 96,2%. Por su parte, la aplicación de puntos de corte optimizados redujo la sensibilidad al 20,9% y aumentó la especificidad hasta el 100% (tabla 21).

Tabla 21. Rendimiento diagnóstico de los modelos para la detección de NA en función del criterio de positividad aplicado

Modelo	Criterio	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
Panel ≥1 marcador	LD	72,1	69,2	79,5	60,0
Panel ≥1 marcador	Punto de corte	46,5	81,8	83,3	43,9
Panel ≥2 marcadores	LD	34,9	96,2	93,8	47,2
Panel ≥2 marcadores	Punto de corte	20,9	100	100	39,3

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; LD, límite de detección

3.5. Rendimiento diagnóstico del análisis de mutaciones en *KRAS*

En el análisis del estado mutacional de *KRAS* en la cohorte estudiada, se detectaron mutaciones exclusivamente en el grupo de pacientes con CCR. En concreto, 2 de las 24 muestras correspondientes a este grupo presentaron mutaciones en *KRAS*, lo que representa una sensibilidad del 8,3% (tabla 22). No se identificaron mutaciones en *KRAS* en las muestras procedentes de los sujetos con colonoscopia negativa y ni en pacientes con AA.

Tabla 22. Estado mutacional de *KRAS* en cfDNA en los distintos grupos de estudio

Grupo	*KRAS* no mutado	*KRAS* mutado	Total
NV	**16**	**0**	**16**
AA	**2**	**0**	**2**
CCR	**22**	**2**	**24**
Total	40	2	42

NV: No vigilancia; AA: Adenomas avanzados; CCR: Cáncer colorrectal

Las variantes en *KRAS* se detectaron en 2 de las 42 muestras analizadas, con VAF de 1,8% y 3,6%. Estas correspondieron a los individuos N-19 y N-22, ambos diagnosticados en estadios avanzados (IIIB y IIIC), que presentaban tumores primarios de gran tamaño (14 y 7,2 cm) y concentraciones elevadas de cfDNA (2,41 y 3,46 ng/µL, respectivamente) en comparación con el resto de la cohorte.

Al comparar estos resultados con los obtenidos mediante el panel de metilación, se observó que ambos casos con mutación en *KRAS* presentaban simultáneamente positividad para los seis marcadores epigenéticos analizados.

4. Cuarto objetivo: Evaluar de forma exploratoria la relación entre los biomarcadores moleculares detectados en cfDNA y los resultados de pruebas no invasivas utilizadas en el contexto del CCR, incluyendo la sangre oculta en heces y los marcadores séricos CEA y CA 19-9

4.1. Rendimiento diagnóstico de la sangre oculta en heces

El análisis del test FIT con el límite de detección de 40 ng/L de hemoglobina se realizó en los individuos procedentes del programa de cribado de CCR, previamente derivados tras un resultado positivo en SOH con un punto de corte de 100 ng/L de hemoglobina. Los resultados del rendimiento diagnóstico se resumen en la Tabla 23.

Tabla 23: Rendimiento diagnóstico de la SOH en la cohorte estudiada.

	S (%)	VPP (%)	VPN (%)
Controles vs AA	80,0	47,0	87,7
Controles vs CCR	100	9,7	100
Controles vs NA	82,4	52,3	87,1

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

En la comparación entre controles y AA, la prueba de SOH mostró una sensibilidad del 80,0% (12/15), con un VPP del 47.0% y un VPN del 87,7%. Para la detección de CCR, la prueba de SOH volvió a ser positiva para los dos casos de la cohorte, con un VPP ajustado por prevalencia del 9,7% y un VPN del 100%. En el análisis conjunto de NA, la sensibilidad fue del 82,4% (14/17), con un VPP del 52,3% y un VPN del 87,1%.

En cuanto a la especificidad, se observó una proporción relevante de resultados positivos en individuos del grupo control (11/31), lo que tradujo en una especificidad del 61,3% para la detección de NA.

4.2. Rendimiento diagnóstico del CEA en suero para la detección precoz de lesiones avanzadas

Los niveles séricos de CEA mostraron diferencias entre los tres grupos estudiados (controles, AA y CCR), con una distribución asimétrica en todos ellos, especialmente en el grupo de CCR (Tabla 24).

En el grupo control, la concentración mediana de CEA fue de 1,87 ng/mL (RI: 1,4–2,3), con un único caso por encima del punto de corte clínico. En los individuos con AA, la mediana fue de 2,06 ng/mL (RIC: 0,8–4,1), sin diferencias significativas respecto a los controles.

En el grupo de CCR, los niveles de CEA mostraron una elevada variabilidad, con valores máximos de hasta 818 ng/mL, aunque la mediana se situó en 2,90 ng/mL (RI: 0,8–6,2). Se observaron diferencias estadísticamente significativas únicamente entre los grupos control y CCR (p = 0,015).

Tabla 24. Distribución de los niveles séricos de CEA según grupo diagnóstico.

	Mediana (ng/mL)	RI (p25–p75)	Rango (mín–máx)
Controles	1,87	1,4 – 2,3	0,5 – 9,2
AA	2,06	0,8 – 4,1	0,3 – 5,6
CCR	2,90	0,8 – 6,2	0,9 – 818,0

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Kruskal–Wallis, seguida de comparaciones por pares con corrección de Bonferroni. RI: rango intercuartílico; NV: No vigilancia; AA: Adenomas avanzados; CCR: Cáncer colorrectal

Utilizando el punto de corte clínico habitual de 5 ng/mL, se evaluó el rendimiento diagnóstico del CEA para la detección de AA, CCR y NA (Tabla 25).

Tabla 25. Rendimiento diagnóstico del CEA

	S (%)	VPP (%)	VPN (%)
Controles vs AA	13,3%	66,7%	71,1%
Controles vs CCR	30,3%	90,9%	58,2%
Controles vs NA	25%	92,3%	47,1%

S: sensibilidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; AA: Adenomas avanzados; CCR: Cáncer colorrectal NA: Neoplasia avanzada

En la comparación entre controles y AA, el CEA mostró una sensibilidad del 13,3% (2/15), con un VPP del 66,7% (2/3) y un VPN del 71,1% (21/45). Para la detección de CCR, la sensibilidad fue del 30,3% (10/33), con un VPP del 90,9% (10/11) y un VPN del 58,2% (32/55).

En el análisis conjunto de NA, la sensibilidad fue del 25,0% (12/48), con un VPP del 92,3% (12/13) y un VPN del 47,1% (32/68). La especificidad global estimada a partir del grupo control fue del 96,9%.

4.2.1. Evaluación de otros puntos de corte para el CEA

Con el objetivo de explorar el impacto del punto de corte del CEA en el rendimiento diagnóstico del marcador, se realizó un análisis adicional utilizando un umbral de 3 µg/L (tabla 26).

Tabla 26. Rendimiento diagnóstico del CEA con el punto de corte de 3 µg/L

Comparación	S (%)	VPP (%)	VPN (%)
Controles vs AA	26,7%	44,4%	71,8%
Controles vs CCR	45,5%	75,0%	60,9%
Controles vs NA	39,6%	79,2%	49,1%

S: sensibilidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; AA: Adenomas avanzados; CCR: Cáncer colorrectal NA: Neoplasia avanzada

Al aplicar un punto de corte de 3 µg/L, se observó un incremento de la sensibilidad en los distintos escenarios analizados, acompañado de una disminución de la especificidad.

En la comparación entre controles y AA, la sensibilidad fue del 26,7% (4/15), con un VPP del 44,4% (4/9) y un VPN del 71,8% (18/39). Para la detección de CCR, la sensibilidad alcanzó el 45,5% (15/33), con un VPP del 75,0% (15/20) y un VPN del 60,9% (28/46).

En el análisis conjunto de NA, la sensibilidad global fue del 39,6% (19/48), con un VPP del 79,2% (19/24) y un VPN del 49,1% (28/57). La especificidad global del marcador a este punto de corte fue del 84,8%.

4.3. Análisis de CA 19-9 sérico

El marcador CA 19-9 se analizó exclusivamente en el subgrupo de individuos diagnosticados de CCR (N-1, N-5 y N-22). De los casos evaluados, el 9,7% (3/31) presentó valores por encima del punto de corte clínico establecido (37 kU/L), que correspondieron todos ellos a individuos en estadios avanzados de la enfermedad.

4.4. Comparación global entre marcadores epigenéticos y marcadores séricos convencionales

Se realizó un análisis conjunto de los resultados obtenidos con el panel de marcadores epigenéticos y los marcadores séricos CEA y CA 19-9.

Entre los pacientes con CCR y valores de CEA superiores a 5 ng/mL, se observó positividad para al menos un biomarcador de metilación en 9 de los 10 individuos analizados. La distribución individual de estos resultados se muestra en la Figura 15.

ID	Grupo	CEA (ng/mL)	[cfADN] (ng/ul)	SEPT9 % (eventos FAM)	EYA4 % (eventos FAM)	SDC2 % (eventos FAM)	ITGA4 % (eventos FAM)	MAP3K14-AS1 % (eventos FAM)	PRIMA1 % (eventos FAM)
3	AA	5,42	0,63	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1 (5)
28	AA	5,56	0,43	NA	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
37	NV	9,19	0,44	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-1	CCR III-IV	818	8,07	2,68 (44)	4,1 (62)	2,63 (188)	3,42 (142)	4,4 (126)	1,82 (39)
N-5	CCR III-IV	224	1,38	<LD	0,56 (5)	0,14 (5)	0,26 (5)	<LD	0,45 (5)
N-6	CCR III-IV	16,6	1,35	<LD	<LD	0,22 (5)	<LD	<LD	0,39 (3)
N-8	CCR I-II	7,5	0,97	<LD	0,5 (4)	<LD	<LD	<LD	0,9 (8)
N-10	CCR III-IV	6	0,85	6,31 (28)	54 (303)	41 (783)	41 (421)	49 (275)	15 (94)
N-13	CCR III-IV	7,1	2,59	<LD	1,37 (16)	0,14 (4)	0,91 (12)	3,08 (12)	0,91 (9)
N-14	CCR I-II	18,3	1,27	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
N-16	CCR I-II	9,2	0,86	<LD	1,07 (3)	1,62 (15)	<LD	<LD	<LD
N-21	CCR III-IV	10,6	3,16	<LD	0,48 (3)	<LD	<LD	<LD	<LD
N-22	CCR III-IV	5,7	3,46	43,8 (129)	19,3 (198)	25,2 (573)	28,6 (352)	36,5 (146)	22,1 (121)

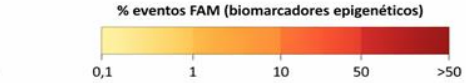


Figura 15. Representación individual de los niveles séricos de CEA y del perfil de metilación en cfDNA en pacientes con valores elevados de CEA (>5 ng/mL). NV: No vigilancia; AA: Adenomas avanzados; CCR I-II: Cáncer colorrectal en estadios iniciales; CCR III-IV: Cáncer colorrectal en estadios avanzados; <LD: inferior al límite de detección; NA: No analizado

Por otro lado, hay una serie de pacientes con CEA por debajo de 5 ng/mL que presentaban positividad para al menos dos marcadores epigenéticos (figura 16). En este grupo de pacientes, 6 de estos individuos pertenecían al grupo de CCR, 3 a AA y uno al grupo de control.

Este último individuo del grupo control, presentaba un polipo serrado de 7 mm y un adenoma tubular de 3 mm.

Finalmente, los dos individuos con mutaciones en *KRAS* detectadas en plasma (N-19 y N-22), que presentaban positividad para los seis marcadores epigenéticos, mostraron concentraciones de CEA de 5,7 y 1,6 ng/mL, respectivamente.

ID	Grupo	CEA (ng/mL)	[cfADN] (ng/ul)	SEPT9 % (eventos FAM)	EYA4 % (eventos FAM)	SDC2 % (eventos FAM)	ITGA4 % (eventos FAM)	MAP3K14-AS1 % (eventos FAM)	PRIMA1 % (eventos FAM)
17	CCR I-II	2.85	1.28	<LD	0,50 (4)	<LD	<LD	<LD	0,61 (4)
19	AA	1.49	1.75	<LD	0,33 (3)	<LD	0,39 (8)	<LD	0,46 (5)
41	AA	4.04	0.83	<LD	1,05 (4)	<LD	<LD	<LD	2,4 (6)
42	AA	1.52	1.31	<LD	0,54 (6)	<LD	0,75 (7)	<LD	1,14 (10)
47	NV	1.41	2.11	1 (4)	0,96 (4)	<LD	<LD	<LD	<LD
N-3	CCR I-II	2.3	1.64	<LD	0,76 (4)	0,39 (11)	<LD	<LD	<LD
N-4	CCR III-IV	3.0	1.02	<LD	<LD	0,6 (16)	0,31 (5)	<LD	0,65 (6)
N-7	CCR III-IV	0.9	0.66	<LD	2,41 (6)	8,65 (36)	<LD	<LD	9,09 (8)
N-15	CCR I-II	1.1	1.81	<LD	<LD	<LD	0,34 (5)	<LD	0,38 (3)
N-19	CCR III-IV	1.6	2.41	9,03 (33)	3,45 (25)	5,49 (114)	4,8 (50)	12,1 (49)	6,72 (50)

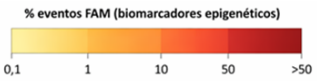


Figura 16. Representación individual de los niveles séricos de CEA y del perfil de metilación en cfDNA en pacientes con valores de CEA dentro del rango de normalidad (<5 ng/mL) y positividad para al menos dos biomarcadores epigenéticos. NV: No vigilancia; AA: Adenomas avanzados; CCR I-II: Cáncer colorrectal en estadios iniciales; CCR III-IV: Cáncer colorrectal en estadios avanzados; <LD: inferior al límite de detección

En el caso del CA 19-9, la elevación del marcador se observó en un subgrupo reducido de pacientes con CCR. En estos tres casos, se detectó simultáneamente una mayor concentración de cfDNA y positividad para múltiples marcadores epigenéticos, con entre 4 y 6 marcadores positivos en el panel analizado (Figura 17).

ID	CA19.9 kU/L	[cfADN] (ng/ul)	SEPT9 % (eventos FAM)	EYA4 % (eventos FAM)	SDC2 % (eventos FAM)	ITGA4 % (eventos FAM)	MAP3K14-AS1 % (eventos FAM)	PRIMA1 % (eventos FAM)
N-1	591,1	8,07	2,68 (44)	4,1 (62)	2,63 (188)	3,42 (142)	4,4 (126)	1,82 (39)
N-5	132,1	1,38	<LD	0,56 (5)	0,14 (5)	0,26 (5)	<LD	0,45 (5)
N-22	52,3	3,46	43,8 (129)	19,3 (198)	25,2 (573)	28,6 (352)	36,5 (146)	22,1 (121)



Figura 17. Resulados del panel de biomarcadores epigenéticos en individuos positivos a CA 19-9

Discusión

El desarrollo de biomarcadores basados en cfDNA para la detección precoz del CCR se enfrenta a desafíos derivados tanto de la complejidad biológica del ctDNA como de las limitaciones técnicas asociadas a su análisis. La baja fracción de ctDNA en estadios iniciales condiciona de forma significativa la sensibilidad de los ensayos (181), que representa una de las principales barreras para su implementación en el contexto del cribado. Sin embargo, estudios recientes están aumentado la evidencia a favor del uso del ctDNA para la detección precoz y el cribado de pacientes con cáncer (136,149,182). En esta línea, el desarrollo de metodologías robustas, sensibles y reproducibles constituye un requisito fundamental para avanzar en la implementación de estas pruebas en el diagnóstico clínico.

1. Desarrollo y validación del procedimiento de análisis de cfDNA mediante ddPCR

En el presente estudio se abordó de forma sistemática el desarrollo, optimización y validación de un procedimiento basado en ddPCR para la detección de biomarcadores epigenéticos en cfDNA. El desarrollo del método se llevó a cabo partiendo de una fase inicial sin experiencia previa del laboratorio en este tipo de análisis, lo que implicó la necesidad de diseñar e implementar de forma integral todas las etapas del proceso analítico.

La optimización de las condiciones de amplificación y del conjunto del procedimiento analítico se identificó como un elemento clave para garantizar un rendimiento adecuado del ensayo, especialmente en el contexto del análisis de cfDNA tratado con bisulfito. En este tipo de aproximaciones, pequeñas variaciones en parámetros experimentales como la eficiencia de la conversión, las condiciones de hibridación o la temperatura de *melting* pueden tener un impacto significativo tanto en la sensibilidad como en la especificidad del método (183,184). Esta marcada dependencia de las condiciones experimentales aumenta la complejidad del análisis de metilación en cfDNA mediante técnicas basadas en PCR, en las que el diseño y la optimización

de cebadores y sondas constituyen factores determinantes para el rendimiento del ensayo (63). El proceso de optimización llevado a cabo en este estudio permitió ajustar de forma progresiva estos parámetros para mejorar la eficiencia global del sistema y reducir la probabilidad de amplificaciones inespecíficas.

La elevada especificidad observada en los controles para los biomarcadores analizados confirma la robustez del diseño de las sondas y la idoneidad de las condiciones de amplificación optimizadas. Este parámetro tiene especial relevancia en el contexto del cfDNA, donde la baja abundancia de la señal tumoral requiere una discriminación precisa entre secuencias metiladas y no metiladas para evitar la generación de falsos positivos. Para uno de los diseños, se observó una aparente inespecificidad para el biomarcador *EYA4*, donde la sonda diseñada para detectar secuencias metiladas mostró señal en el control comercial no metilado, equivalente aproximadamente a una proporción del 50% de secuencias. Este resultado, sin embargo, no se reprodujo en las muestras clínicas analizadas, en las que se observó una elevada frecuencia de resultados negativos en individuos con colonoscopia normal. En este caso concreto, la señal detectada en el control comercial se interpreta como un falso positivo probablemente relacionado con características intrínsecas de la muestra de referencia, más que como una limitación del diseño del ensayo.

El análisis de las muestras de individuos reclutados del Programa de Cribado de CCR puso de manifiesto unas limitaciones técnicas relevantes en relación con la capacidad de detección de los biomarcadores a partir de volúmenes reducidos de muestra de plasma. La necesidad de distribuir el ADN extraído entre los distintos ensayos dirigidos a cada uno de los seis biomarcadores implicó una reducción del número de copias diana disponibles por reacción, condicionando de forma significativa la sensibilidad analítica del método. En muchos casos, la cantidad de ADN analizada por reacción osciló entre 0,5 y 2 ng, lo que equivale aproximadamente a 75–300 genomas equivalentes. Como consecuencia de ello, el número total

de eventos detectados por biomarcador fue frecuentemente bajo (entre 40 y 100 eventos, o incluso inferior), lo que limitó la capacidad de detección de eventos positivos correspondientes al biomarcador metilado a únicamente a dos de los biomarcadores evaluados, que presentaban 3 o más eventos en FAM.

Este comportamiento es coherente con las limitaciones inherentes al análisis de ctDNA en plasma, donde la fracción tumoral puede ser extremadamente baja, especialmente en contextos de cribado poblacional (113,128). Dado que la baja disponibilidad de moléculas de ADN por reacción restringe la capacidad de la PCR digital para generar un número suficiente de eventos de amplificación detectables, la sensibilidad analítica de los ensayos se ve comprometida en estas condiciones experimentales. Este fenómeno explica la limitada detección observada y refuerza la necesidad de considerar la cantidad de ADN de entrada como un parámetro clave en el diseño experimental. En estudios recientes que emplean aproximaciones similares, la baja cantidad de cfDNA de entrada se identifica como una limitación crítica del rendimiento analítico, hasta el punto de establecer umbrales mínimos de ADN y de copias de control interno para garantizar la detectabilidad y minimizar la aparición de falsos negativos (185).

Por este motivo, se consideró necesario plantear una optimización del método, para maximizar el número de copias analizadas por reacción y mejorar así la capacidad de detección de los marcadores epigenéticos en muestras de plasma.

El proceso de preamplificación se limitó a un número reducido de ciclos (cinco ciclos), con el objetivo de preservar en la medida de lo posible la representación relativa de las secuencias presentes en la muestra original. Esta estrategia supuso una mejora clara en la capacidad de detección de todos los biomarcadores analizados, en consonancia con el incremento observado en el número de eventos detectados tras la optimización, que alcanzó valores de hasta un orden de magnitud superior respecto al protocolo inicial.

Al mismo tiempo, este enfoque permitió minimizar el riesgo de introducir sesgos derivados de amplificaciones diferenciales, donde la eficiencia de amplificación puede variar entre secuencias metiladas y no metiladas en función de las condiciones experimentales (186). De este modo, se logró equilibrar el incremento en la cantidad de ADN disponible con el mantenimiento de la fidelidad del perfil molecular, un aspecto especialmente relevante en el análisis de CtDNA.

Un punto crítico fue el establecimiento de los criterios de positividad para cada uno de los biomarcadores, que tiene un impacto directo en el equilibrio entre sensibilidad y especificidad del ensayo.

La definición de los criterios de positividad se abordó mediante una aproximación individualizada para cada biomarcador, basada en la distribución de eventos observada en los controles negativos. Los datos obtenidos mostraron una variabilidad significativa en la señal basal entre los distintos biomarcadores, lo que hizo necesario establecer umbrales específicos para cada diana. El establecimiento de un umbral mínimo de tres eventos positivos como LD en PCR digital ha sido previamente propuesto para la detección de mutaciones de oncogenes en ensayos donde el límite del blanco es de cero (180), lo que respalda el criterio adoptado para el estudio de varios de los marcadores. Sin embargo, la presencia de señal de fondo en algunos biomarcadores condicionó la definición de los puntos de corte, requiriendo la adopción de criterios alternativos, como el uso de abundancia relativa en lugar de número absoluto de eventos. En el caso del marcador *EYA4*, la elevada señal observada en los controles negativos impidió establecer un punto de corte basado exclusivamente en estos, lo que hizo necesario considerar el comportamiento global del marcador en el conjunto de muestras analizadas para definir su criterio de positividad.

La evaluación del panel en muestras de cfDNA de individuos con CCR metastásico donde la presencia de ctDNA está inequívocamente confirmada mediante una técnica alternativa es un paso clave en la validación analítica del ensayo. La detección de variantes somáticas por NGS a

alta profundidad, con fracciones alélicas superiores al LD del ensayo, garantiza que las muestras analizadas contienen ctDNA. Esto permite eliminar la incertidumbre sobre si la ausencia de señal es consecuencia de la falta de ctDNA, como ocurre frecuentemente en estadios precoces, o a las limitaciones intrínsecas de detectabilidad del ensayo desarrollado.

Además, la observación de fracciones alélicas comparables, e incluso superiores, en los análisis por ddPCR respecto a las VAF obtenidas por NGS refuerza la fiabilidad del método desarrollado y su capacidad para detectar variantes a frecuencias próximas al límite de detección de la NGS de alta profundidad. Estos resultados respaldan la validez analítica del ensayo en términos de detectabilidad y lo posicionan a un nivel comparable al de metodologías comerciales empleadas para el análisis de mutaciones en cfDNA. Sin embargo, la menor detectabilidad para algunos biomarcadores epigenéticos observada en muestras con baja VAF pone de manifiesto la necesidad de optimizar variables tanto preanalíticas como analíticas, lo que podría resultar determinante en la maximización del rendimiento del ensayo. Aumentar el volumen de plasma de partida, la optimización en el proceso de extracción de cfDNA o el incremento del número de ciclos de preamplificación podrían ser algunas de las posibilidades.

Es importante destacar que los resultados de la comparativa con los análisis por NGS ponen de manifiesto otros dos aspectos relevantes. En primer lugar, la concordancia entre las VAF de las mutaciones somáticas y los porcentajes de metilación de los biomarcadores seleccionados sugiere que éstos presentan un origen tumoral. Este punto es especialmente importante, dado que las alteraciones epigenéticas pueden detectarse en cfDNA no tumoral. Sin embargo, su asociación con muestras con ctDNA confirmado refuerza su especificidad biológica. Además, estos hallazgos son concordantes con los valores de β metilación prácticamente nulos descritos para estos biomarcadores en mucosa colónica normal (43,170), por que respalda la utilización del LD de la técnica como punto de corte para la definición de positividad. En segundo lugar, resulta relevante destacar que las muestras analizadas presentan distintas mutaciones

somáticas detectadas por NGS, cuya positividad depende del diseño específico del panel y de los genes incluidos en el mismo. Esta limitación implica que los ensayos de biopsia líquida basados en mutaciones quedan restringidos a las regiones cubiertas, de modo que tumores que albergan alteraciones no incluidas en el panel podrían no ser detectados, incluso en pacientes con una elevada carga de ctDNA. El abordaje con el panel de marcadores epigenéticos responde a una estrategia basada en "marcadores universales" para la detección de CCR, lo que se refleja en la positividad observada en muestras de individuos con perfiles mutacionales heterogéneos. Este enfoque permite superar parcialmente las limitaciones inherentes a los paneles dirigidos exclusivamente a mutaciones.

En conjunto, esta fase de optimización en muestras con ctDNA confirmado demuestra que el panel presenta un rendimiento adecuado en condiciones biológicas favorables, caracterizadas por una mayor disponibilidad de ctDNA. Sin embargo, es necesario validar estos resultados en cohortes más amplias que incluyan individuos sin enfermedad, con lesiones precursoras y casos en diferentes estadios del CCR, con el fin de determinar su utilidad real antes de plantear su aplicación en los diferentes escenarios clínicos.

2. Evaluación analítica de la detección de mutaciones en *KRAS* en cfDNA

El análisis de mutaciones en *KRAS* mediante ddPCR en cfDNA se fundamentó en la elevada prevalencia de alteraciones en este gen en el CCR. Esta prevalencia se sitúa en global en el 43% en los tumores de CCR no hipermutados (187). En contexto de enfermedad metastásica, su prevalencia se ha situado en torno a una mediana del 38% según revisiones sistemáticas (188), pudiendo llegar a detectarse en el plasma de hasta el 46% de los individuos (189).

Desde el punto de vista metodológico y en comparación con otras plataformas comerciales disponibles para el análisis de ctDNA, la ddPCR ha mostrado una de las mayores sensibilidades para la detección de mutaciones en *KRAS*, lo que refuerza su idoneidad para la identificación de

variantes de baja frecuencia en muestras con limitada carga tumoral (189). Además, la localización recurrente de estas mutaciones en regiones específicas del gen, principalmente en los codones 12 y 13, posiciona los enfoques dirigidos basados en PCR digital de *KRAS* como especialmente adecuados desde el punto de vista de la eficiencia analítica y del coste-efectividad, frente a aproximaciones más amplias como la secuenciación en paralelo de múltiples genes por secuenciación masiva.

El enfoque multiplex constituye una estrategia que optimiza el uso de la muestra, un aspecto especialmente relevante en el análisis de cfDNA, ya que evita la necesidad de extraer volúmenes elevados de sangre y preserva el carácter mínimamente invasivo de la prueba. Sin embargo, este tipo de ensayos introduce una mayor complejidad analítica, dado que la coexistencia de múltiples sondas en una misma reacción puede afectar a la eficiencia relativa de amplificación y generar fenómenos de competencia entre dianas. La elección de sondas modificadas tipo LNA para la discriminación de variantes puntuales contribuye a mejorar la especificidad del ensayo, debido a su mayor afinidad de hibridación y al incremento de la temperatura de *melting*, lo que permite una unión más estable y selectiva, especialmente relevante para la detección de variantes somáticas de baja frecuencia (190,191).

Los resultados obtenidos en los ensayos multiplex realizados en controles indican que el sistema permite una adecuada discriminación entre alelos mutados y *wild-type*, incluso en condiciones de alta carga de ADN próximas a la saturación del ensayo. Este comportamiento refuerza la robustez del diseño analítico y resulta especialmente relevante en el análisis de mutaciones puntuales, donde la correcta discriminación entre variantes es crítica para minimizar la aparición de falsos positivos derivados de la unión inespecífica de las sondas.

La evaluación de la sensibilidad analítica del ensayo multiplex de *KRAS* mostró que el método permite alcanzar una elevada capacidad de detección de variantes de baja frecuencia, confirmando detecciones de mutaciones a una frecuencia alélica aproximada del 1%. La

definición de un umbral de detección correspondiente a una frecuencia alélica aproximada del 0,17% bajo las condiciones experimentales empleadas, sitúa el ensayo dentro de los rangos de sensibilidad esperables para la ddPCR en la detección de mutaciones somáticas.

Sin embargo, el nivel de sensibilidad podría variar en las muestras clínicas, que se caracterizan por una menor cantidad de ADN de partida, mayor fragmentación y una fracción de ctDNA altamente variable. El establecimiento del LD basado en un umbral absoluto de eventos, derivado de un modelo de distribución de Poisson, constituye un enfoque robusto para controlar la probabilidad de falsos positivos en PCR digital, pero este tipo de aproximación no tiene en cuenta de forma explícita el número total de copias analizadas en cada reacción, que puede variar entre muestras y condicionar la interpretación de la señal detectada. En este sentido, aunque el umbral de 11 eventos establecido permite definir una señal detectable con un alto grado de confianza estadística, su significado en términos de frecuencia alélica puede diferir en función del número total de eventos evaluados. Esto sugiere que, en contextos con variabilidad en la cantidad de ADN disponible, como es el caso de los estudios de cfDNA, la incorporación de criterios adicionales basados en la frecuencia alélica o en modelos probabilísticos integrados podría contribuir a una interpretación más precisa de los resultados.

3. Evaluación del rendimiento diagnóstico de los biomarcadores basados en cfDNA

La evaluación clínica piloto realizada en este estudio representa un paso clave en la traslación de los ensayos desarrollados desde el ámbito analítico hacia su aplicabilidad en el entorno clínico. A diferencia de los estudios en condiciones controladas, el análisis en muestras de individuos integra la variabilidad biológica y preanalítica inherente al cfDNA en poblaciones heterogéneas, proporcionando una estimación más realista de su rendimiento diagnóstico. Este aspecto resulta especialmente relevante en el contexto del CCR, donde la liberación de ctDNA

al torrente circulatorio es altamente variable, pudiendo representar desde menos del 0,01% hasta la mayor parte del cfDNA total en plasma (181,192), lo que condiciona de forma significativa el rendimiento diagnóstico (193,194).

En línea con lo descrito previamente, en este estudio se observó un incremento de las concentraciones de cfDNA en los pacientes con CCR en comparación con los controles, reflejo de procesos biológicos asociados al tumor, como apoptosis, necrosis y aumento del recambio celular (194). No obstante, este incremento en el cfDNA total no implica necesariamente una mayor fracción tumoral, ya que la contribución específica dentro del cfDNA presenta una elevada variabilidad interindividual y constituye uno de los principales factores limitantes para la sensibilidad del ensayo, especialmente en estadios iniciales (181,193).

El análisis del rendimiento diagnóstico del panel de marcadores epigenéticos está determinado principalmente por tres factores: la carga tumoral, el criterio de positividad y la estrategia de combinación de biomarcadores.

En primer lugar, la capacidad de detección muestra una clara dependencia del estadio tumoral, con un aumento progresivo de la sensibilidad desde adenomas avanzados hasta CCR, alcanzando valores máximos en estadios avanzados. Este comportamiento es coherente con la biología del ctDNA, cuya liberación está estrechamente relacionada con el volumen tumoral y la actividad celular (113,181,195). En consecuencia, el panel presenta un mejor rendimiento en contextos de elevada carga tumoral, con una sensibilidad más limitada en lesiones precursoras y enfermedad temprana.

En segundo lugar, el criterio de positividad ejerce un impacto determinante en el rendimiento del ensayo. El uso de umbrales basados en el límite de detección analítico favorece la captación de señal en condiciones de baja abundancia, y aumenta la sensibilidad a expensas de una menor especificidad. Por el contrario, la aplicación de puntos de corte más restrictivos permite mejorar la especificidad, aunque con una pérdida de sensibilidad. Este comportamiento refleja el

compromiso inherente entre ambos parámetros y pone de manifiesto que la definición del umbral de positividad constituye un elemento clave para la aplicabilidad del ensayo.

En tercer lugar, la combinación de biomarcadores permite modular este equilibrio. La estrategia basada en la positividad de al menos un biomarcador maximiza la sensibilidad global, lo que podría resultar de interés en contextos de cribado o detección precoz. Por el contrario, criterios más restrictives, basados en la exigencia de al menos dos biomarcadores positivos permite alcanzar especificidades muy elevadas, cercanas o iguales al 100%, lo que podría ser útil en escenarios donde se requiera una mayor confirmación diagnóstica.

Los resultados de este estudio muestran que cada biomarcador presenta una sensibilidad y especificidad individual para la detección de AA y CCR. El análisis individual de los biomarcadores permitió valorar hasta qué punto el comportamiento observado en nuestra serie reproducía el descrito en las publicaciones que motivaron su selección. En general, el rendimiento de cada marcador se debe interpretar considerando que los estudios originales se realizaron en contextos metodológicos y clínicos distintos, con diferencias en el tipo de muestra, volumen de plasma, plataforma analítica, criterios de positividad y composición de la cohorte. Por ello, el interés de esta comparación no reside únicamente en confirmar o no los valores de sensibilidad y especificidad publicados, sino en determinar qué biomarcadores mantienen un comportamiento robusto cuando se trasladan a un procedimiento basado en ddPCR y a una cohorte clínica propia.

El biomarcador *SEPT9* mostró en nuestro estudio una sensibilidad claramente inferior a la descrita en el trabajo de Ma et al. (142), basado en ddPCR. En dicho estudio, la sensibilidad alcanzaba aproximadamente el 70% en el punto de corte óptimo, con una especificidad cercana al 50%. El uso de umbrales más restrictivos permitía incrementar la especificidad hasta valores próximos al 100%, a expensas de una reducción de la sensibilidad hasta alrededor del 40% (142). El elevado nivel de especificidad observado en nuestro estudio para la detección de NA (96%)

resulta relevante considerando que se ha empleado el LD de la técnica ddPCR como criterio de positividad. Estos resultados sugieren que, a pesar de utilizar un umbral analíticamente sensible, la detección del marcador de *SEPT9* en cfDNA es muy limitada, lo que se traduce en una baja sensibilidad y restringe su utilidad como biomarcador individual. En línea con estudios previos (196), esta baja sensibilidad, especialmente en AA, podría indicar que los niveles de metilación de *SEPT9* en tejido no se traducen necesariamente en niveles detectables en plasma.

Los biomarcadores *SDC2* y *PRIMA1*, seleccionados a partir del estudio de Barták et al. (143), han sido descritos como biomarcadores para la detección no invasiva de CCR y AA, con elevadas tasas de metilación en plasma tanto en CCR como en adenomas. En dicho trabajo, la metilación del marcador en los promotores de *SDC2* y *PRIMA1* se encontraron en el 89,4% y 80,9% de las muestras de individuos con CCR, y en el 81,1% y 70,3% en AA, con especificidades superiores al 90% (143). En nuestro estudio, el comportamiento de ambos biomarcadores reproduce parcialmente este patrón. *SDC2* mantiene una elevada especificidad y una clara asociación con la presencia de CCR, lo que respalda su robustez como marcador epigenético en cfDNA, aunque su sensibilidad es considerablemente inferior a la descrita. Por su parte, *PRIMA1* presenta una sensibilidad moderada tanto en CCR como en AA, con una especificidad algo menor. Estas diferencias respecto a los resultados previos pueden explicarse, al menos en parte, por variaciones metodológicas como el volumen de plasma analizado y el input molecular utilizado para cado ensayo. En el estudio de Barták et al. (143) se describen concentraciones de cfDNA superiores a las observadas en nuestra cohorte; sin embargo, la ausencia de información detallada sobre el volumen de plasma limita la comparabilidad directa entre ambos estudios.

Los biomarcadores en *EYA4*, *ITGA4* y *MAP3K14-AS1*, seleccionados a partir del estudio de Barault et al. (146) en contextos de enfermedad avanzada, mostraban tasas de positividad cercanas al 70% para los tres marcadores. En el subgrupo de pacientes de nuestro estudio con enfermedad avanzada, se observa un patrón concordante con estos hallazgos, donde *EYA4* presentó una

sensibilidad del 69,2%, y fue el marcador más robusto dentro de este grupo. Por otra parte, *ITGA4* mostró una sensibilidad intermedia (53,8%), mientras que *MAP3K14-AS1* presentó un rendimiento más limitado, con positividad en el 38,5% de los casos. En el análisis global de la cohorte, *EYA4* mantiene el mejor rendimiento relativo, con una mayor sensibilidad tanto en CCR como en AA y una especificidad elevada. Por el contrario, *ITGA4* y *MAP3K14-AS1* muestran sensibilidades más limitadas, junto con especificidades muy elevadas, lo que indica una mayor dependencia de la carga tumoral y de la fracción de ctDNA para su detección.

La integración de los biomarcadores en un panel combinado permite equilibrar los parámetros de sensibilidad y especificidad, y proporcionan una estimación más representativa del rendimiento diagnóstico global del ensayo. Este enfoque basado en la detección por ddPCR de un panel múltiplex de biomarcadores epigenéticos en sangre se ha abordado recientemente como prueba de concepto para detección precoz de varios tipos de cáncer (185). En dicho estudio, se alcanzó una sensibilidad global del 69,2% para la detección de CCR en plasma, con una especificidad del 91,0% al considerar la positividad de al menos un marcador, y de una sensibilidad del 53.9% con una especificidad del 100% con dos mardadores positivos.

En nuestro estudio, el modelo basado en la positividad de un biomarcador mostró una sensibilidad para la detección de CCR con uno de los biomarcadores fue de un 77,4% y una especificidad del 68,2%. El criterio más restrictivo, basado en la positividad de dos o más biomarcadores, permitió incrementar la especificidad, aunque a expensas de una reducción de la sensibilidad. Estas diferencias pueden explicarse por variaciones en los criterios de inclusión y en la estrategia analítica, ya que en el estudio anterior se establecen requisitos adicionales, como un umbral mínimo de concentración de cfDNA y puntos de corte más restrictivos, que permiten minimizar la tasa de falsos negativos.

El rendimiento del panel de biomarcadores fue superior para la detección de CCR en comparación con los adenomas avanzados, en línea con estudios recientes de biopsia líquida en

contexto de cribado que muestran una mayor sensibilidad para la detección de CCR frente a lesiones preneoplásicas (149,150). A resaltar que, en este grupo de individuos, la sensibilidad observada para la detección de AA sugiere que el panel podría captar, al menos en parte, alteraciones moleculares presentes en fases tempranas del proceso neoplásico.

Entre los individuos con CCR, la sensibilidad del panel fue superior en los estadios avanzados respecto a los estadios iniciales, y se llega a alcanzar una sensibilidad del 100% con la positividad de un único marcador en individuos en estadios III y IV. Los resultados observados en estos pacientes con CCR avanzado son coherentes con otros estudios donde se encuentra una mayor detectabilidad del ctDNA en enfermedad metastásica (181) y que es superior a la mayoría de los marcadores tumorales convencionales (197).

Sin embargo, estos hallazgos deben interpretarse con cautela en el contexto de cribado poblacional, donde la prevalencia de la enfermedad condiciona de forma determinante los valores predictivos. Por ello, a pesar de la elevada sensibilidad observada en determinados subgrupos, el valor predictivo positivo se ve limitado en escenarios de baja prevalencia, especialmente para CCR, con un valor predictivo negativo que se mantiene elevado.

La aplicación de criterios más restrictivos de positividad permite incrementar el valor predictivo positivo a expensas de una reducción del valor predictivo negativo. Este comportamiento pone de manifiesto que la utilidad clínica del panel depende en gran medida del contexto de aplicación, y es más adecuado como herramienta de exclusión en poblaciones de bajo riesgo y potencialmente como prueba confirmatoria en escenarios con mayor probabilidad pretest de enfermedad.

En este sentido, la especificidad observada al emplear criterios basados en el LD, resulta insuficiente para su aplicación en programas de detección precoz. En poblaciones de cribado, caracterizadas por una mayor proporción de lesiones iniciales, la baja y variable fracción de

ctDNA no solo limita la sensibilidad, sino que también puede favorecer la detección de señales inespecíficas.

Desde el punto de vista clínico, una especificidad reducida implicaría un número elevado de falsos positivos, con la consiguiente derivación innecesaria a colonoscopia y el impacto asociado en términos de costes y carga asistencial. Estos falsos positivos podrían estar relacionados con la detección de señales de metilación derivadas de cfDNA no tumoral, dado que las alteraciones epigenéticas no son totalmente específicas del tejido tumoral y pueden estar presentes en otros contextos biológicos, como procesos inflamatorios o cambios asociados al envejecimiento (198). En global, estos resultados indican que, en su estado actual, el panel presenta limitaciones para su implementación como herramienta de cribado primaria. Sin embargo, el ensayo es susceptible de optimización mediante ajustes en su diseño analítico, como el incremento de los ciclos de preamplificación para mejorar la sensibilidad mediante la optimización del diseño analítico, incluyendo ajustes en los criterios de positividad, el uso de puntos de corte basados en el porcentaje de metilación o el incremento de los ciclos de preamplificación para mejorar la sensibilidad en condiciones de baja fracción de ctDNA.

Por otro lado, el panel podría tener un papel relevante en otros escenarios clínicos, como en contexto de detección de enfermedad mínima residual o la monitorización de la enfermedad, donde la elevada especificidad y la capacidad de detección de señal molecular adquieren un mayor valor clínico.

4. Rendimiento del análisis de mutaciones de *KRAS* en el estudio piloto

En la presente cohorte, el análisis de mutaciones en *KRAS* en cfDNA mostró una sensibilidad limitada para la detección de CCR, con identificación de mutaciones en menos del 10% de los casos y una especificidad del 100%. La inclusión de este biomarcador en el estudio se

fundamentó en la elevada prevalencia en enfermedad de alteraciones en *KRAS* en el CCR avanzado (188,189); sin embargo, la baja sensibilidad observada en este estudio refleja tanto las características clínicas de la cohorte como las limitaciones inherentes al análisis de mutaciones en ctDNA en estadios no metastásicos.

En nuestro estudio, la detección de mutaciones en *KRAS* se limitó a dos individuos con enfermedad en estadios avanzados (IIIB y IIIC) y tumores de gran tamaño, lo que refuerza la relación entre carga tumoral elevada y mayor probabilidad de detección en plasma. Aunque las mutaciones somáticas en *KRAS* pueden estar presentes en AA y en estadios iniciales de CCR, la baja liberación de ctDNA en estas fases, junto con la reducida fracción alélica tumoral y la heterogeneidad clonal característica del CCR, limita significativamente su detectabilidad en cfDNA.

En contraste, las alteraciones epigenéticas basadas en la metilación del ADN presentan características que favorecen su detección en fases más tempranas, al afectar de forma más extensa y relativamente homogénea a múltiples regiones del genoma tumoral. Este comportamiento incrementa la probabilidad de detección en plasma incluso en contextos de baja carga tumoral (63). Resulta especialmente relevante que los dos casos con mutaciones en *KRAS* presentaran porcentajes elevados de metilación en todos los biomarcadores analizados, con valores que alcanzan hasta el 43,8% en *SEPT9* y superiores al 20% en varios marcadores, a pesar de mostrar frecuencias alélicas mutacionales relativamente bajas (VAF del 1,8% y 3,6%).

En esta línea, los dos casos con mutaciones en *KRAS* presentaban simultáneamente positividad para todos los marcadores epigenéticos analizados, lo que indica que habrían sido detectados independientemente del análisis de *KRAS*. Estos resultados muestran en su conjunto la limitada contribución del análisis de *KRAS* para mejorar la detectabilidad de CCR y AA en el enfoque propuesto.

5. Biomarcadores basados en cfDNA frente a sangre oculta en heces

Los resultados del estudio de SOH mediante FIT en los pacientes que procedían del programa de cribado de CCR mostraron una mayor sensibilidad para la detección de NA en comparación con el panel de biomarcadores en cfDNA (82% frente al 74%), aunque con una especificidad ligeramente inferior (61% frente al 65%). Los resultados obtenidos con FIT en nuestra cohorte son superiores a los descritos en la literatura, donde revisiones sistemáticas y metaanálisis han estimado sensibilidades en torno al 79% para la detección de CCR a puntos de corte de 20 µg Hb/g y del 36% para AA, con especificidades del 94% y 89%, respectivamente, para puntos de corte habituales (104,199).

Esta diferencia puede explicarse por las características de la cohorte analizada. En nuestro estudio, el FIT se evaluó en individuos previamente seleccionados tras un resultado positivo a un punto de corte más elevado, lo que implica una preselección de casos con mayor probabilidad de presentar lesiones sangrantes. Este sesgo de selección favorece una mayor sensibilidad en determinaciones posteriores, a costa de una reducción de la especificidad. La menor especificidad también es coherente con este contexto, ya que la persistencia de resultados positivos en individuos sin hallazgos significativos en la colonoscopia puede atribuirse a causas benignas de sangrado, como hemorroides internas, que contribuyen al aumento de falsos positivos.

Por otro lado, la cohorte utilizada para el análisis de biomarcadores en cfDNA se encuentra enriquecida en pacientes con CCR, al haber sido seleccionados en el momento del diagnóstico, lo que limita la comparabilidad directa entre ambas estrategias y su extrapolación a un contexto de cribado poblacional. En este sentido, el rendimiento de los biomarcadores en cfDNA requiere validación en cohortes independientes y representativas de población asintomática.

Finalmente, deben considerarse los aspectos relacionados con la viabilidad de implementación en programas de cribado. Los costes asociados a las tecnologías de análisis de cfDNA, incluyendo plataformas de secuenciación y PCR digital, son significativamente superiores a los del FIT. En una valoración global, el FIT continúa siendo la estrategia de referencia, que presenta una eficacia comparable a la colonoscopia en la reducción de la mortalidad por CCR (78).

6. Biomarcadores basados en cfDNA frente a marcadores tumorales

La sensibilidad mostrada por el CEA utilizando el punto de corte habitual en la práctica clínica (5 µg/L) fue claramente insuficiente para la detección tanto de AA como de CCR, con valores del 13,3% y 30,3%, respectivamente. En contraste, la especificidad fue elevada (96,9%), con un único caso positivo en el grupo control, que correspondía a un individuo fumador. En estos individuos son conocidas las elevaciones de CEA en ausencia de patologia neoplásica subyacente (155,177). Estos resultados son concordantes con los descritos en la literatura, donde el CEA presenta sensibilidades en torno al 30–40% para la detección de CCR, lo que limita su utilidad en el diagnóstico inicial y justifica su empleo actual fundamentalmente en el seguimiento y monitorización de la enfermedad (155,200).

Algunos autores han propuesto reducir los puntos de corte del CEA para incrementar la sensibilidad para la detección de recurrencias (201). En nuestro estudio, la exploración de un punto de corte inferior para el CEA mostró un impacto directo en el rendimiento diagnóstico. Al reducir el punto de corte a 3 µg/L, se observó un incremento de la sensibilidad en todos los escenarios evaluados, que alcanzó un 45,5% para la detección de CCR. Sin embargo, este aumento se produce a expensas de una disminución de la especificidad, que aunque se mantiene en niveles aceptables (84,8%), no compensa la limitada capacidad del marcador para detectar enfermedad en estadios precoces o lesiones precursoras. Por lo tanto, el uso de puntos de corte más bajos podría considerarse en estrategias combinadas con otras herramientas

diagnósticas, pero no resuelve las limitaciones inherentes del CEA como biomarcador de detección precoz.

El análisis de los biomarcadores séricos y del panel de metilación en cfDNA puso de manifiesto que la mayoría de los pacientes con CCR y valores elevados de CEA presentaron simultáneamente positividad para al menos uno de los marcadores epigenéticos (9 de 10 casos). Sin embargo, se identificó también un grupo de pacientes con valores de CEA dentro del rango de normalidad que presentaban positividad para múltiples biomarcadores epigenéticos, incluyendo individuos con CCR y AA. La capacidad de detectar señal molecular en ausencia de elevación de marcadores séricos convencionales podría permitir una evaluación más sensible de la carga tumoral, especialmente en aquellos pacientes en los que el CEA no resulta informativo. Este aspecto sugiere que los biomarcadores basados en cfDNA podrían desempeñar un papel relevante en otros escenarios clínicos más allá del cribado poblacional, como la monitorización de la enfermedad y la detección de enfermedad mínima residual.

Resulta relevante que, entre los hallazgos no esperados, hubiera un individuo control con positividad de dos marcadores (individuo 47). Aunque este caso fue categorizado como de bajo riesgo, ya que presentaba un pólipo serrado de 7 mm y un adenoma tubular de 3 mm, la positividad a dos marcadores epigenéticos en plasma podria ser sugiere que incluso lesiones de pequeño tamaño pueden contribuir a la liberación de ADN al torrente sanguíneo, y la posibilidad de discordancia entre la clasificación clínica basada en criterios endoscópicos y la presencia de alteraciones moleculares detectables.

Desde el punto de vista biológico, estas diferencias pueden explicarse por la naturaleza de los biomarcadores evaluados. El CEA es un marcador proteico cuya elevación está estrechamente relacionada con la carga tumoral y la secreción activa por parte de las células neoplásicas. En

cambio, los biomarcadores basados en metilación reflejan alteraciones epigenéticas presentes en el cfDNA que pueden detectarse en plasma incluso cuando la fracción de ctDNA es baja.

Los resultados en suero con el marcador CA 19-9 revelan una utilidad muy limitada en el contexto del CCR, especialmente en fases iniciales de la enfermedad. La baja tasa de positividad se restringe unicamente a tres individuos en estadios avanzados, que presentan cuatro o más marcadores de metilación positivos en plasma. La elevación de este marcador está asociada a una mayor carga tumoral y su capacidad para detectar enfermedad en estadios precoces o lesiones precursoras es muy baja.

7. Asociación entre características clínico-patológicas y resultados en cfDNA

Los resultados obtenidos en el análisis de biomarcadores en cfDNA permite identificar un patrón entre las características clínico-patológicas del CCR y la detectabilidad de las alteraciones moleculares en plasma. Los casos con mayor carga tumoral y características de enfermedad más avanzada presentaron una mayor frecuencia de positividad del panel. Este patrón fue consistente con otros indicadores de carga tumoral, como concentraciones elevadas de cfDNA y niveles aumentados de marcadores séricos como CEA o CA 19-9, en los que se observó una mayor intensidad de señal molecular en plasma. Este aspecto también se puso de manifiesto en los casos con mutaciones en *KRAS*, en los que se observó una elevada frecuencia de metilación en todos los biomarcadores analizados.

Por el contrario, en estadios iniciales y en lesiones precursoras, la detección de alteraciones moleculares se limita fundamentalmente a biomarcadores epigenéticos. Las mutaciones puntuales en *KRAS*, en cambio, resultan prácticamente indetectables. Las alteraciones de metilación del ADN presentan, en determinados contextos tumorales, un patrón más consistente y homogéneo que las mutaciones somáticas, lo que las convierte en una diana especialmente atractiva para el desarrollo de biomarcadores (60).

Además, la ausencia de detección de mutaciones en *KRAS* en la mayoría de los casos, incluso en presencia de señal epigenética positiva, refuerza la hipótesis de que los enfoques basados exclusivamente en mutaciones pueden infraestimar la presencia de enfermedad cuando la fracción tumoral es baja. El uso combinado de biomarcadores epigenéticos y genéticos podría permitir una caracterización más completa del cfDNA, aunque la contribución adicional del análisis de *KRAS* en el presente estudio resultó limitada.

8. Limitaciones del estudio

El presente trabajo presenta diversas limitaciones que deben considerarse en la interpretación de los resultados, tanto desde el punto de vista biológico como técnico y clínico.

En primer lugar, una de las principales limitaciones deriva de la propia biología del ctDNA. En estadios iniciales y en lesiones precursoras del CCR, la fracción tumoral es extremadamente baja, lo que condiciona una sensibilidad limitada y la tasa de resultados falsamente negativos. Esta limitación es inherente a las técnicas basadas en detección de ctDNA en plasma, donde el ctDNA puede representar una proporción mínima del cfDNA total.

A este condicionante biológico se suman factores preanalíticos que influyen en la cantidad y calidad del cfDNA, entre los que se incluyen el volumen de plasma de partida, la eficiencia de extracción y las condiciones de procesamiento. En nuestro estudio, la utilización de cuatro mililitros de plasma de partida constituye una limitación relevante, especialmente si se compara con otros métodos comerciales no invasivos para la detección precoz basados en cfDNA, que pueden requerir volúmenes de sangre de hasta 40 mL (202). En relación al tratamiento con bisulfito, este se asocia a una degradación del ADN de partida (183), lo que puede comprometer la eficiencia de recuperación del cfDNA y limitar la sensibilidad de los ensayos.

Desde el punto de vista analítico, la sensibilidad de la ddPCR depende directamente del número absoluto de moléculas diana disponibles. En este estudio, estas moléculas se distribuyen entre seis ensayos individuales correspondientes al panel de biomarcadores epigenéticos, lo que disminuye la probabilidad de detección, especialmente en muestras con baja carga tumoral. Teniendo en cuenta todo lo anterior, la decisión de no realizar los ensayos por duplicado respondió a la necesidad de maximizar la cantidad de ADN analizada en cada reacción, ya que la replicación habría supuesto dividir el número de moléculas diana y, por tanto, disminuir aún más la sensibilidad del ensayo.

Desde el punto de vista clínico, el carácter piloto del estudio y la heterogeneidad de la cohorte limitan la potencia estadística y la precisión de las estimaciones, especialmente subgrupos específicos. Además, la ausencia de una cohorte externa independiente impide evaluar la robustez y reproducibilidad de los hallazgos, un aspecto especialmente relevante en estudios de biomarcadores basados en cfDNA, donde pequeñas variaciones metodológicas o poblacionales pueden impactar significativamente en el rendimiento diagnóstico.

La distribución de edad de la cohorte constituye otro aspecto relevante en la interpretación de los resultados. Dado que el envejecimiento puede influir en los patrones de metilación del ADN, no puede descartarse un posible efecto de la edad sobre los resultados obtenidos para los biomarcadores epigenéticos.

Teniendo en cuenta estas limitaciones y el contexto en el que se ha desarrollado este estudio, los resultados obtenidos deben considerarse exploratorios y generadores de hipótesis, ya que requieren de una validación en estudios prospectivos con un tamaño muestral adecuado. Solo mediante este tipo de aproximaciones será posible determinar con precisión su utilidad clínica real y evitar una sobreestimación de su rendimiento en las fases iniciales del desarrollo.

9. Perspectivas futuras

El desarrollo de biomarcadores basados en cfDNA en el cáncer se encuentra en rápida evolución, donde la validación de ensayos de ctDNA con una sensibilidad adecuada permitirá ampliar su aplicación clínica más allá del ámbito experimental. Actualmente, ya existen recomendaciones que avalan el uso de pruebas de ctDNA en la práctica clínica para la identificación de mutaciones accionables y la selección de terapias dirigidas en pacientes con cáncer avanzado, especialmente en situaciones en las que no se dispone de tejido tumoral o cuando se requiere una rápida obtención de resultados (128).

Más allá de este escenario, el ctDNA presenta un elevado potencial para su integración en diferentes etapas del manejo clínico del cáncer, incluyendo el diagnóstico o detección precoz, la detección de enfermedad mínima residual y el seguimiento de la enfermedad durante el tratamiento (138). Sin embargo, su principal limitación continúa siendo la baja sensibilidad en contextos de enfermedad temprana, donde la fracción de ctDNA es reducida. En este sentido, el desarrollo de tecnologías más sensibles, como la secuenciación de nueva generación y la PCR digital, constituye una línea prioritaria de investigación (138,203).

La optimización de la cantidad de muestra analizada por ensayo representa un aspecto clave para mejorar la sensibilidad de los ensayos basados en cfDNA. El incremento del volumen de plasma analizado permitiría aumentar el número absoluto de moléculas diana, lo que resulta especialmente relevante en escenarios de baja carga tumoral. Además, la evolución de las plataformas de PCR digital a sistemas con un mayor número de canales de fluorescencia permitirá una multiplexación de orden superior, de forma que pueda facilitar el análisis simultáneo de un mayor número de biomarcadores sin necesidad de fraccionar la muestra y optimizar el uso del cfDNA de partida.

De forma complementaria, la estandarización de los procedimientos preanalíticos y analíticos es fundamental para garantizar la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados. Iniciativas internacionales como BloodPAC y Cancer-ID están orientadas al desarrollo de protocolos armonizados que faciliten la implementación clínica de estos biomarcadores a gran escala (204,205).

En el ámbito clínico, serán necesarios estudios prospectivos de gran escala que validen estos biomarcadores en condiciones reales y evalúen su impacto en resultados clínicos relevantes, como la reducción de mortalidad o el coste-efectividad. La evidencia actual indica que aunque el ctDNA presenta un gran potencial en el diagnóstico precoz, su implementación en programas de cribado requiere aún una mejora sustancial en sensibilidad y validación poblacional (128,193,206).

En comparación con otras estrategias de cribado establecidas en EEUU como el FIT anual, la colonoscopia cada 10 años o los test de ADN en heces multitarget cada 3 años, estudios de coste efectividad han mostrado que los ensayos basados en sangre que cumplen los umbrales mínimos de sensibilidad y especificidad definidos por los Centers for Medicare & Medicaid Services (de un 74% y 90%, respectivamente) permiten reducir la incidencia y la mortalidad por CCR, aunque en menor medida y con un mayor coste que las otras estrategias (152). La sensibilidad para la detección de AA es el factor determinante en la efectividad global de la prueba, ya que incluso en escenarios optimistas, con una sensibilidad del 50% para AA y una participación en los programas del 80%, las pruebas basadas en biopsia líquida requerirían un coste considerablemente inferior al actual para alcanzar una relación coste-efectividad comparable a la del FIT. Solo ensayos con sensibilidades superiores al 90% para la detección de CCR y en torno al 80% para AA podrían aproximarse a la coste-efectividad del FIT, asumiendo las mismas tasas de participación en ambos programas de cribado (148). En la actualidad, su principal valor podría ser la ampliación del cribado a individuos que rechazan las estrategias

convencionales, donde podrían contribuir a reducir la incidencia y mortalidad de CCR en comparación con la ausencia de cribado. La oferta de pruebas no invasivas tras el rechazo de la colonoscopia puede aumentar significativamente la participación en los programas de cribado, con una clara preferencia por las pruebas basadas en sangre frente a las basadas en heces (207).

Otra posible línea de desarrollo consiste en la incorporación de los análisis de cfDNA como una segunda prueba no invasiva como paso intermedio antes de la colonoscopia y utilizada como prueba complementaria tras un resultado positivo en FIT. Este enfoque permitiría refinar la estratificación del riesgo y optimizar la selección de pacientes candidatos a colonoscopia. Sin embargo, la implementación de este tipo de estrategias requerirá demostrar que la introducción de esta segunda prueba no compromete la sensibilidad global del programa de cribado, especialmente en la detección de AA, y que aporta un beneficio en términos de coste-efectividad y eficiencia clínica.

De forma adicional, los biomarcadores basados en cfDNA podrían tener un papel relevante en subgrupos específicos de pacientes en los que las estrategias convencionales presentan limitaciones. Entre ellos, destacan aquellos individuos con colonoscopias repetidamente no concluyentes debido a una preparación inadecuada, así como pacientes frágiles o con comorbilidades significativas, en los que la realización de una colonoscopia puede suponer un mayor riesgo clínico y la indicación de colonoscopia debe individualizarse considerando el balance riesgo-beneficio (73). En estos escenarios, la utilización de pruebas no invasivas podría contribuir a una mejor estratificación del riesgo y a la toma de decisiones clínicas individualizadas.

En conjunto, los análisis basados en cfDNA se posicionan como herramientas con un elevado potencial para complementar las estrategias actuales de cribado y manejo del CCR, aunque su implementación clínica generalizada dependerá de la superación de las limitaciones actuales. Su

desarrollo deberá orientarse hacia enfoques integradores que combinen distintos tipos de biomarcadores y/o se incorporen en algoritmos secuenciales de decisión clínica.

Los resultados del presente estudio se sitúan dentro de esta fase inicial de desarrollo, aportando una prueba de concepto sobre la viabilidad de una aproximación basada en la detección de múltiples biomarcadores mediante una de las tecnologías actualmente más sensibles desde el punto de vista analítico, y contribuyendo a delimitar tanto su potencial como sus limitaciones en el escenario del diagnóstico no invasivo del CCR, sentando así las bases para futuras estrategias orientadas a su optimización y eventual aplicación clínica.

Conclusiones

Conclusiones

1. Se ha desarrollado y optimizado un procedimiento analítico basado en ddPCR para el análisis en plasma de un panel de seis biomarcadores epigenéticos asociados al cáncer colorrectal, con elevada sensibilidad y especificidad analítica, y una capacidad de detección comparable a la observada mediane técnicas de NGS de alta profundidad.

2. Se ha desarrollado y optimizado un ensayo multiplex basado en ddPCR para la detección en plasma de mutaciones frecuentes en *KRAS*, con adecuada sensibilidad y especificidad analítica para las variantes incluidas en el diseño.

3. En el estudio clínico piloto, los biomarcadores epigenéticos evaluados de forma independiente mostraron un rendimiento diagnóstico limitado para la detección de cáncer colorrectal y lesiones precursoras avanzadas; no obstante, su análisis combinado permitió aumentar la proporción de casos detectados.

4. La estrategia basada en la detección de al menos un biomarcador epigenético positivo mostró la mayor sensibilidad diagnóstica. En cambio, la detección de dos o más biomarcadores positivos incrementó la especificidad, aunque a expensas de una reducción de la sensibilidad.

5. El panel de biomarcadores epigenéticos mostró un mayor rendimiento diagnóstico en estadios avanzados de la enfermedad, con positividad para al menos un biomarcador epigenético en todos los casos de cáncer colorrectal avanzado.

6. En el contexto clínico evaluado, el análisis de mutaciones en *KRAS* en plasma mostró una alta especificidad diagnóstica, aunque no incrementó la sensibilidad global para la detección de cáncer colorrectal.

7. El análisis de cfDNA permitió identificar señal molecular en plasma en casos con marcadores séricos dentro del rango de normalidad, aunque la sangre oculta en heces mostró un mayor rendimiento para la detección de neoplasia avanzada en el contexto de cribado.

8. En su estado actual, los métodos desarrollados no presentan un rendimiento suficiente para su aplicación como herramienta de cribado poblacional. No obstante, los resultados obtenidos demuestran la viabilidad del análisis de biomarcadores epigenéticos y genéticos en cfDNA mediante ddPCR como aproximación no invasiva para la detección de señal tumoral en cáncer colorrectal, y sientan las bases para futuras estrategias de optimización y validación en otros escenarios clínicos.

Referencias

Referencias

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. maig 2024;74(3):229-63. doi:10.3322/caac.21834

2. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin. maig 2023;73(3):233-54. doi:10.3322/caac.21772

3. Sinicrope FA. Increasing Incidence of Early-Onset Colorectal Cancer. N Engl J Med. 21 abril 2022;386(16):1547-58. doi:10.1056/NEJMra2200869 PubMed PMID: 35443109.

4. Zaborowski AM, Abdile A, Adamina M, Aigner F, d'Allens L, Allmer C, et al. Characteristics of Early-Onset vs Late-Onset Colorectal Cancer: A Review. JAMA Surg. 1 setembre 2021;156(9):865-74. doi:10.1001/jamasurg.2021.2380 PubMed PMID: 34190968.

5. Araghi M, Soerjomataram I, Bardot A, Ferlay J, Cabasag CJ, Morrison DS, et al. Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. Lancet Gastroenterol Hepatol. juliol 2019;4(7):511-8. doi:10.1016/S2468-1253(19)30147-5 PubMed PMID: 31105047; PubMed Central PMCID: PMC7617144.

6. Murphy N, Campbell PT, Gunter MJ. Unraveling the Etiology of Early-Onset Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst. 4 maig 2021;113(5):505-6. doi:10.1093/jnci/djaa165 PubMed PMID: 33136122.

7. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 abril 2017;35(10):1086-95. doi:10.1200/JCO.2016.71.0012 PubMed PMID: 28135145; PubMed Central PMCID: PMC5455355.

8. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. N Engl J Med. 5 març 1992;326(10):658-62. doi:10.1056/NEJM199203053261002 PubMed PMID: 1736104.

9. Tuohy TMF, Rowe KG, Mineau GP, Pimentel R, Burt RW, Samadder NJ. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. Cancer. 1 gener 2014;120(1):35-42. doi:10.1002/cncr.28227 PubMed PMID: 24150925.

10. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. N Engl J Med. 1 novembre 1990;323(18):1228-33. doi:10.1056/NEJM199011013231802 PubMed PMID: 2215606.

11. Olén O, Erichsen R, Sachs MC, Pedersen L, Halfvarson J, Askling J, et al. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study. Lancet Lond Engl. 11 gener 2020;395(10218):123-31. doi:10.1016/S0140-6736(19)32545-0 PubMed PMID: 31929014.

12. Owens CA, Ludmir EB, Liu Q, Qiu W, Gupta AC, Smith SA, et al. Colorectal-Specific Radiation Dose and Chemotherapy Risk for Subsequent Colorectal Malignancies in Childhood Cancer Survivors: A Childhood Cancer Survivor Study (CCSS) Report. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. novembre 2025;43(31):3403-21. doi:10.1200/JCO-25-00531 PubMed PMID: 41032739; PubMed Central PMCID: PMC12573684.

13. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. Cancers. 17 abril 2024;16(8). doi:10.3390/cancers16081530 PubMed PMID: 38672612; PubMed Central PMCID: PMC11049480.

14. Yousef M, Yousef A, Chowdhury S, Fanaeian MM, Knafl M, Peterson J, et al. Molecular, Socioeconomic, and Clinical Factors Affecting Racial and Ethnic Disparities in Colorectal Cancer Survival. JAMA Oncol. 1 novembre 2024;10(11):1519-29. doi:10.1001/jamaoncol.2024.3666 PubMed PMID: 39264607; PubMed Central PMCID: PMC11393757.

15. Yamada A, Komaki Y, Komaki F, Micic D, Zullow S, Sakuraba A. Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol. juny 2018;19(6):758-67. doi:10.1016/S1470-2045(18)30188-8 PubMed PMID: 29706374.

16. Fukuda I, Hizuka N, Murakami Y, Itoh E, Yasumoto K, Sata A, et al. Clinical features and therapeutic outcomes of 65 patients with acromegaly at Tokyo Women's Medical University. Intern Med Tokyo Jpn. octubre 2001;40(10):987-92. doi:10.2169/internalmedicine.40.987 PubMed PMID: 11688841.

17. Park JM, Choi MG, Kim SW, Chung IS, Yang CW, Kim YS, et al. Increased incidence of colorectal malignancies in renal transplant recipients: a case control study. Am J Transplant

Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. setembre 2010;10(9):2043-50. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03231.x PubMed PMID: 20883538.

18. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. N Engl J Med. 25 agost 2016;375(8):794-8. doi:10.1056/NEJMsr1606602 PubMed PMID: 27557308; PubMed Central PMCID: PMC6754861.

19. He J, Stram DO, Kolonel LN, Henderson BE, Le Marchand L, Haiman CA. The association of diabetes with colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort. Br J Cancer. 29 juny 2010;103(1):120-6. doi:10.1038/sj.bjc.6605721 PubMed PMID: 20531412; PubMed Central PMCID: PMC2905298.

20. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. Gastroenterology. febrer 2008;134(2):388-95. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.007 PubMed PMID: 18242207.

21. McNabb S, Harrison TA, Albanes D, Berndt SI, Brenner H, Caan BJ, et al. Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. Int J Cancer. 1 febrer 2020;146(3):861-73. doi:10.1002/ijc.32377 PubMed PMID: 31037736; PubMed Central PMCID: PMC6819207.

22. Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. PloS One. 2011;6(6):e20456. doi:10.1371/journal.pone.0020456 PubMed PMID: 21674008; PubMed Central PMCID: PMC3108955.

23. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. Lancet Lond Engl. 19 octubre 2019;394(10207):1467-80. doi:10.1016/S0140-6736(19)32319-0 PubMed PMID: 31631858.

24. Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. Cell. 18 juliol 2013;154(2):274-84. doi:10.1016/j.cell.2013.07.004 PubMed PMID: 23870119.

25. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, Kujala P, Van Den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature. octubre 2007;449(7165):1003-7. doi:10.1038/nature06196

26. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:695-723. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.092805 PubMed PMID: 15473857.

27. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. Cell. 13 octubre 2000;103(2):311-20. doi:10.1016/s0092-8674(00)00122-7 PubMed PMID: 11057903.

28. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell. 18 octubre 1996;87(2):159-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81333-1 PubMed PMID: 8861899.

29. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature. 17 setembre 1992;359(6392):235-7. doi:10.1038/359235a0 PubMed PMID: 1528264.

30. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science. 21 març 1997;275(5307):1784-7. doi:10.1126/science.275.5307.1784 PubMed PMID: 9065401.

31. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science. 21 març 1997;275(5307):1787-90. doi:10.1126/science.275.5307.1787 PubMed PMID: 9065402.

32. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. Lancet Lond Engl. 19 juliol 2003;362(9379):205-9. doi:10.1016/S0140-6736(03)13910-4 PubMed PMID: 12885482.

33. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1 juny 1990;61(5):759-67. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-i PubMed PMID: 2188735.

34. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. Gastroenterology. gener 2020;158(2):291-302. doi:10.1053/j.gastro.2019.08.059 PubMed PMID: 31622622; PubMed Central PMCID: PMC6981255.

35. Kim YH, Petko Z, Dzieciatkowski S, Lin L, Ghiassi M, Stain S, et al. CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of

colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer. agost 2006;45(8):781-9. doi:10.1002/gcc.20341 PubMed PMID: 16708352.

36. Gharib E, Robichaud GA. From Crypts to Cancer: A Holistic Perspective on Colorectal Carcinogenesis and Therapeutic Strategies. Int J Mol Sci. 30 agost 2024;25(17). doi:10.3390/ijms25179463 PubMed PMID: 39273409; PubMed Central PMCID: PMC11395697.

37. Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. maig 1999;17(5):1375-81. doi:10.1200/JCO.1999.17.5.1375 PubMed PMID: 10334521.

38. Xie W, Rimm DL, Lin Y, Shih WJ, Reiss M. Loss of Smad signaling in human colorectal cancer is associated with advanced disease and poor prognosis. Cancer J Sudbury Mass. agost 2003;9(4):302-12. doi:10.1097/00130404-200307000-00013 PubMed PMID: 12967141.

39. Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, et al. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. Cancer Res. 15 juliol 1992;52(14):3965-71. PubMed PMID: 1319835.

40. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. Genes Dev. 15 maig 1994;8(10):1174-83. doi:10.1101/gad.8.10.1174 PubMed PMID: 7926722.

41. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. Gastroenterology. juny 2010;138(6):2059-72. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065 PubMed PMID: 20420946; PubMed Central PMCID: PMC4243705.

42. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. The oncologist. desembre 2008;13(12):1270-5. doi:10.1634/theoncologist.2008-0181 PubMed PMID: 19056857.

43. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 18 juliol 2012;487(7407):330-7. doi:10.1038/nature11252 PubMed PMID: 22810696; PubMed Central PMCID: PMC3401966.

44. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res. 15 novembre 1998;58(22):5248-57. PubMed PMID: 9823339.

45. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. Nat Genet. juliol 2006;38(7):787-93. doi:10.1038/ng1834 PubMed PMID: 16804544.

46. Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. Gastroenterology. gener 2007;132(1):127-38. doi:10.1053/j.gastro.2006.09.018 PubMed PMID: 17087942.

47. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. Nature. 29 agost 2002;418(6901):934. doi:10.1038/418934a PubMed PMID: 12198537.

48. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. Oncogene. 2 juny 2005;24(24):3995-8. doi:10.1038/sj.onc.1208569 PubMed PMID: 15782118.

49. Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R, Walsh MD, Whitehall VLJ, Pike T, et al. High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. Gastroenterology. novembre 2006;131(5):1400-7. doi:10.1053/j.gastro.2006.08.038 PubMed PMID: 17101316.

50. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med. novembre 2015;21(11):1350-6. doi:10.1038/nm.3967 PubMed PMID: 26457759; PubMed Central PMCID: PMC4636487.

51. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. Nat Rev Cancer. febrer 2017;17(2):79-92. doi:10.1038/nrc.2016.126 PubMed PMID: 28050011.

52. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. Gastroenterology. setembre 2001;121(3):599-611. doi:10.1053/gast.2001.27203 PubMed PMID: 11522744.

53. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med. 1 setembre 1988;319(9):525-32. doi:10.1056/NEJM198809013190901 PubMed PMID: 2841597.

54. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. J Natl Cancer Inst. 15 desembre 1993;85(24):2004-7. doi:10.1093/jnci/85.24.2004 PubMed PMID: 8246286.

55. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 març 2009;27(7):1130-6. doi:10.1200/JCO.2008.19.8168 PubMed PMID: 19124802.

56. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. N Engl J Med. 23 desembre 2004;351(26):2704-14. doi:10.1056/NEJMoa033403 PubMed PMID: 15616205.

57. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. Cancer Res. 1 març 1997;57(5):808-11. PubMed PMID: 9041175.

58. Mojarad EN, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2013;6(3):120-8. PubMed PMID: 24834258; PubMed Central PMCID: PMC4017514.

59. van Engeland M, Derks S, Smits KM, Meijer GA, Herman JG. Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 abril 2011;29(10):1382-91. doi:10.1200/JCO.2010.28.2319 PubMed PMID: 21220596.

60. Warton K, Samimi G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. Front Mol Biosci. 22 abril 2015;2:13. doi:10.3389/fmolb.2015.00013 PubMed PMID: 25988180; PubMed Central PMCID: PMC4428375.

61. Constâncio V, Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C. DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types. Cells. 5 març 2020;9(3):624. doi:10.3390/cells9030624 PubMed PMID: 32150897; PubMed Central PMCID: PMC7140532.

62. Boeckx N, Beeck KO de, Beyens M, Deschoolmeester V, Hermans C, Clercq PD, et al. Mutation and Methylation Analysis of Circulating Tumor DNA Can Be Used for Follow-up of Metastatic Colorectal Cancer Patients. Clin Colorectal Cancer. 1 juny 2018;17(2):e369-79. doi:10.1016/j.clcc.2018.02.006 PubMed PMID: 29605591.

63. Galardi F, Luca FD, Romagnoli D, Biagioni C, Moretti E, Biganzoli L, et al. Cell-Free DNA-Methylation-Based Methods and Applications in Oncology. Biomolecules. 15 desembre 2020;10(12). doi:10.3390/biom10121677 PubMed PMID: 33334040; PubMed Central PMCID: PMC7765488.

64. Barault L, Amatu A, Bleeker FE, Moutinho C, Falcomatà C, Fiano V, et al. Digital PCR quantification of MGMT methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer. Ann Oncol. 1 setembre 2015;26(9):1994-9. doi:10.1093/annonc/mdv272 PubMed PMID: 26113646.

65. Taryma-Leśniak O, Sokolowska KE, Wojdacz TK. Current status of development of methylation biomarkers for in vitro diagnostic IVD applications. Clin Epigenetics. 6 juliol 2020;12(1):100. doi:10.1186/s13148-020-00886-6 PubMed PMID: 32631437; PubMed Central PMCID: PMC7336678.

66. Moiel D, Thompson J. Early detection of colon cancer-the kaiser permanente northwest 30-year history: how do we measure success? Is it the test, the number of tests, the stage, or the percentage of screen-detected patients? Perm J. Fall 2011;15(4):30-8. doi:10.7812/tpp/11-128 PubMed PMID: 22319413; PubMed Central PMCID: PMC3267557.

67. 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. març 2016;15(1):67-73. doi:10.1016/j.clcc.2015.07.004 PubMed PMID: 26602596.

68. Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. Br J Cancer. 22 agost 2005;93(4):399-405.

doi:10.1038/sj.bjc.6602714 PubMed PMID: 16106247; PubMed Central PMCID: PMC2361578.

69. Thompson MR, O'Leary DP, Flashman K, Asiimwe A, Ellis BG, Senapati A. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). Br J Surg. setembre 2017;104(10):1393-404. doi:10.1002/bjs.10573 PubMed PMID: 28634990.

70. Demb J, Kolb JM, Dounel J, Fritz CDL, Advani SM, Cao Y, et al. Red Flag Signs and Symptoms for Patients With Early-Onset Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. JAMA Netw Open. 1 maig 2024;7(5):e2413157. doi:10.1001/jamanetworkopen.2024.13157 PubMed PMID: 38787555; PubMed Central PMCID: PMC11127127.

71. Sarma EA, Thompson MJ, Bowles EJA, Burnett-Hartman AN, Hubbard RA, Yu O, et al. Patient and Tumor Characteristics of Screening-Age Adults Diagnosed with Screen-Detected versus Symptomatic Colon Cancer. Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel. novembre 2022;24(11):1344-51. doi:10.1111/codi.16232 PubMed PMID: 35739634; PubMed Central PMCID: PMC10018485.

72. Cardoso R, Guo F, Heisser T, De Schutter H, Van Damme N, Nilbert MC, et al. Proportion and stage distribution of screen-detected and non-screen-detected colorectal cancer in nine European countries: an international, population-based study. Lancet Gastroenterol Hepatol. agost 2022;7(8):711-23. doi:10.1016/S2468-1253(22)00084-X PubMed PMID: 35561739.

73. US Preventive Services Task Force. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. JAMA. 2021;325(19):1965-77. doi:10.1001/jama.2021.6238

74. Bressler B, Paszat LF, Chen Z, Rothwell DM, Vinden C, Rabeneck L. Rates of new or missed colorectal cancers after colonoscopy and their risk factors: a population-based analysis. Gastroenterology. gener 2007;132(1):96-102. doi:10.1053/j.gastro.2006.10.027 PubMed PMID: 17241863.

75. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, Marmo R. Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis. Radiology. maig

2011;259(2):393-405. doi:10.1148/radiol.11101887 PubMed PMID: 21415247; PubMed Central PMCID: PMC3079122.

76. Whitlock EP, Lin JS, Liles E, Beil TL, Fu R. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med. 4 novembre 2008;149(9):638-58. doi:10.7326/0003-4819-149-9-200811040-00245 PubMed PMID: 18838718.

77. Reumkens A, Rondagh EJA, Bakker CM, Winkens B, Masclee AAM, Sanduleanu S. Post-Colonoscopy Complications: A Systematic Review, Time Trends, and Meta-Analysis of Population-Based Studies. Am J Gastroenterol. agost 2016;111(8):1092-101. doi:10.1038/ajg.2016.234 PubMed PMID: 27296945.

78. Lv XH, Lu Q, Wang ZJ, Wang Z, Yang JL. Colonoscopy-Related Adverse Events in the 21st Century: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Gastroenterol. 1 gener 2026;121(1):212-21. doi:10.14309/ajg.0000000000003429 PubMed PMID: 40146012.

79. Amin MB, Edge SB, Greene FL, editors. AJCC Cancer Staging Manual. 8a ed. New York (NY): Springer; 2017.

80. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. octubre 2020;31(10):1291-305. doi:10.1016/j.annonc.2020.06.022 PubMed PMID: 32702383.

81. Benson AB, Venook AP, Adam M, Chang G, Chen YJ, Ciombor KK, et al. Colon Cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Cancer Netw JNCCN. juny 2024;22(2 D):e240029. doi:10.6004/jnccn.2024.0029 PubMed PMID: 38862008.

82. Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. CA Cancer J Clin. 2018;68(4):250-81. doi:10.3322/caac.21457

83. Issaka RB, Chan AT, Gupta S. AGA Clinical Practice Update on Risk Stratification for Colorectal Cancer Screening and Post-Polypectomy Surveillance: Expert Review. Gastroenterology. novembre 2023;165(5):1280-91. doi:10.1053/j.gastro.2023.06.033 PubMed PMID: 37737817; PubMed Central PMCID: PMC10591903.

84. Hassan C, Antonelli G, Dumonceau JM, Regula J, Bretthauer M, Chaussade S, et al. Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline - Update 2020. Endoscopy. agost 2020;52(8):687-700. doi:10.1055/a-1185-3109 PubMed PMID: 32572858.

85. Gupta S, Lieberman D, Anderson JC, Burke CA, Dominitz JA, Kaltenbach T, et al. Recommendations for Follow-Up After Colonoscopy and Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Gastroenterology. març 2020;158(4):1131-1153.e5. doi:10.1053/j.gastro.2019.10.026 PubMed PMID: 32044092; PubMed Central PMCID: PMC7672705.

86. Screening for colorectal cancer: recommendation and rationale. Ann Intern Med. 16 juliol 2002;137(2):129-31. doi:10.7326/0003-4819-137-2-200207160-00014 PubMed PMID: 12118971.

87. Jain S, Maque J, Galoosian A, Osuna-Garcia A, May FP. Optimal Strategies for Colorectal Cancer Screening. Curr Treat Options Oncol. abril 2022;23(4):474-93. doi:10.1007/s11864-022-00962-4 PubMed PMID: 35316477; PubMed Central PMCID: PMC8989803.

88. Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Hoffmeister M. Long-term risk of colorectal cancer after negative colonoscopy. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 octubre 2011;29(28):3761-7. doi:10.1200/JCO.2011.35.9307 PubMed PMID: 21876077.

89. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF, Saskin R, Urbach DR, Rabeneck L. Association of colonoscopy and death from colorectal cancer. Ann Intern Med. 6 gener 2009;150(1):1-8. doi:10.7326/0003-4819-150-1-200901060-00306 PubMed PMID: 19075198.

90. Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Rickert A, Hoffmeister M. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study. Ann Intern Med. 4 gener 2011;154(1):22-30. doi:10.7326/0003-4819-154-1-201101040-00004 PubMed PMID: 21200035.

91. Brenner H, Chang-Claude J, Jansen L, Knebel P, Stock C, Hoffmeister M. Reduced risk of colorectal cancer up to 10 years after screening, surveillance, or diagnostic colonoscopy. Gastroenterology. març 2014;146(3):709-17. doi:10.1053/j.gastro.2013.09.001 PubMed PMID: 24012982.

92. Lin JS, Perdue LA, Henrikson NB, Bean SI, Blasi PR. Screening for Colorectal Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. JAMA. 18 maig 2021;325(19):1978-98. doi:10.1001/jama.2021.4417 PubMed PMID: 34003220.

93. Zavoral M, Suchanek S, Zavada F, Dusek L, Muzik J, Seifert B, et al. Colorectal cancer screening in Europe. World J Gastroenterol. 21 desembre 2009;15(47):5907-15. doi:10.3748/wjg.15.5907 PubMed PMID: 20014454; PubMed Central PMCID: PMC2795177.

94. Shaukat A, Kahi CJ, Burke CA, Rabeneck L, Sauer BG, Rex DK. ACG Clinical Guidelines: Colorectal Cancer Screening 2021. Am J Gastroenterol. 1 març 2021;116(3):458-79. doi:10.14309/ajg.0000000000001122 PubMed PMID: 33657038.

95. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización [Internet]. Sec. 1, Orden SSI/2065/2014. 6 novembre 2014. p. 91369-82. Disponible a: https://www.boe.es/eli/es/o/2014/10/31/ssi2065

96. Se amplía a los 74 años el cribado de cáncer de colon y recto [Internet]. [citat 17 abril 2026]. Disponible a: https://web.gencat.cat/es/ciutadania/actualitat/noticies/2026/03/s-amplia-als-74-anys-el-cribratge-de-cancer-de-colon-i-recte

97. Aragón P por CI. Aragón amplía hasta los 74 años el programa de detección precoz de cáncer colorrectal [Internet]. 11 març 2026 [citat 17 abril 2026]. Disponible a: https://www.iisaragon.es/aragon-amplia-hasta-los-74-anos-el-programa-de-deteccion-precoz-de-cancer-colorrectal/

98. Ministerio de Sanidad - Áreas - INFORMACIÓN GENERAL - CRIBADO CANCER - CANCER COLORRECTAL [Internet]. [citat 17 abril 2026]. Disponible a: https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/cribado/cribadoCancer/cancerColon/infoGeneral.htm

99. Mannucci A, Goel A. Stool and blood biomarkers for colorectal cancer management: an update on screening and disease monitoring. Mol Cancer. 19 novembre 2024;23:259.

doi:10.1186/s12943-024-02174-w PubMed PMID: 39558327; PubMed Central PMCID: PMC11575410.

100. Doubeni CA, Corley DA, Jensen CD, Levin TR, Ghai NR, Cannavale K, et al. Fecal Immunochemical Test Screening and Risk of Colorectal Cancer Death. JAMA Netw Open. 1 juliol 2024;7(7):e2423671. doi:10.1001/jamanetworkopen.2024.23671 PubMed PMID: 39028667; PubMed Central PMCID: PMC11259903.

101. Chiu HM, Jen GHH, Wang YW, Fann JCY, Hsu CY, Jeng YC, et al. Long-term effectiveness of faecal immunochemical test screening for proximal and distal colorectal cancers. Gut. desembre 2021;70(12):2321-9. doi:10.1136/gutjnl-2020-322545 PubMed PMID: 33495268; PubMed Central PMCID: PMC8588305.

102. Quintero E, Castells A, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, Lanas Á, et al. Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening. N Engl J Med. 23 febrer 2012;366(8):697-706. doi:10.1056/NEJMoa1108895 PubMed PMID: 22356323.

103. Levin TR, Corley DA, Jensen CD, Schottinger JE, Quinn VP, Zauber AG, et al. Effects of Organized Colorectal Cancer Screening on Cancer Incidence and Mortality in a Large Community-Based Population. Gastroenterology. novembre 2018;155(5):1383-1391.e5. doi:10.1053/j.gastro.2018.07.017 PubMed PMID: 30031768; PubMed Central PMCID: PMC6240353.

104. Lee JK, Liles EG, Bent S, Levin TR, Corley DA. Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med. 4 febrer 2014;160(3):171. doi:10.7326/M13-1484 PubMed PMID: 24658694; PubMed Central PMCID: PMC4189821.

105. Imperiale TF, Porter K, Zella J, Gagrat ZD, Olson MC, Statz S, et al. Next-Generation Multitarget Stool DNA Test for Colorectal Cancer Screening. N Engl J Med. 14 març 2024;390(11):984-93. doi:10.1056/NEJMoa2310336 PubMed PMID: 38477986.

106. Barnell EK, Wurtzler EM, La Rocca J, Fitzgerald T, Petrone J, Hao Y, et al. Multitarget Stool RNA Test for Colorectal Cancer Screening. JAMA. 14 novembre 2023;330(18):1760-8. doi:10.1001/jama.2023.22231 PubMed PMID: 37870871; PubMed Central PMCID: PMC10594178.

107. Robertson DJ, Lee JK, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, et al. Recommendations on fecal immunochemical testing to screen for colorectal neoplasia: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. Gastrointest Endosc. gener 2017;85(1):2-21.e3. doi:10.1016/j.gie.2016.09.025 PubMed PMID: 27769516.

108. Castells A, Quintero E, Bujanda L, Castán-Cameo S, Cubiella J, Díaz-Tasende J, et al. Effect of invitation to colonoscopy versus faecal immunochemical test screening on colorectal cancer mortality (COLONPREV): a pragmatic, randomised, controlled, non-inferiority trial. Lancet Lond Engl. 12 abril 2025;405(10486):1231-9. doi:10.1016/S0140-6736(25)00145-X PubMed PMID: 40158525.

109. A Stool DNA Test (Cologuard) for Colorectal Cancer Screening. JAMA. 17 desembre 2014;312(23):2566. doi:10.1001/jama.2014.15746

110. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. N Engl J Med. 3 abril 2014;370(14):1287-97. doi:10.1056/NEJMoa1311194 PubMed PMID: 24645800.

111. Liang PS, Zaman A, Kaminsky A, Cui Y, Castillo G, Tenner CT, et al. Blood Test Increases Colorectal Cancer Screening in Persons Who Declined Colonoscopy and Fecal Immunochemical Test: A Randomized Controlled Trial. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. octubre 2023;21(11):2951-2957.e2. doi:10.1016/j.cgh.2023.03.036 PubMed PMID: 37037262; PubMed Central PMCID: PMC10523873.

112. Coronado GD, Jenkins CL, Shuster E, Johnson C, Amy D, Cook J, et al. Blood-based colorectal cancer screening in an integrated health system: a randomised trial of patient adherence. Gut. 7 març 2024;73(4):622-8. doi:10.1136/gutjnl-2023-330980 PubMed PMID: 38176899.

113. Sánchez-Herrero E, Serna-Blasco R, Robado de Lope L, González-Rumayor V, Romero A, Provencio M. Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: An Overview of Biological Features and Factors That may Impact on ctDNA Analysis. Front Oncol. 20 juliol 2022;12. doi:10.3389/fonc.2022.943253

114. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YD. Predominant Hematopoietic Origin of Cell-free DNA in Plasma and Serum after Sex-mismatched Bone Marrow Transplantation. Clin Chem. 1 març 2002;48(3):421-7. doi:10.1093/clinchem/48.3.421

115. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. Cancer Biol Ther. 3 agost 2019;20(8):1057-67. doi:10.1080/15384047.2019.1598759 PubMed PMID: 30990132.

116. Holdenrieder S, Nagel D, Schalhorn A, Heinemann V, Wilkowski R, Von Pawel J, et al. Clinical Relevance of Circulating Nucleosomes in Cancer. Ann N Y Acad Sci. 2008;1137(1):180-9. doi:10.1196/annals.1448.012

117. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. Cell. 14 gener 2016;164(1):57-68. doi:10.1016/j.cell.2015.11.050 PubMed PMID: 26771485.

118. Keller L, Belloum Y, Wikman H, Pantel K. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. Br J Cancer. gener 2021;124(2):345-58. doi:10.1038/s41416-020-01047-5

119. Grabuschnig S, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S, Rosales Rodriguez I, Schliep KP, Schwendenwein D, et al. Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms. Int J Mol Sci. 29 octubre 2020;21(21):8062. doi:10.3390/ijms21218062 PubMed PMID: 33137955; PubMed Central PMCID: PMC7662960.

120. Underhill HR. Leveraging the Fragment Length of Circulating Tumour DNA to Improve Molecular Profiling of Solid Tumour Malignancies with Next-Generation Sequencing: A Pathway to Advanced Non-invasive Diagnostics in Precision Oncology? Mol Diagn Ther. juliol 2021;25(4):389-408. doi:10.1007/s40291-021-00534-6 PubMed PMID: 34018157; PubMed Central PMCID: PMC8249304.

121. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. Cancer Metastasis Rev. setembre 2016;35(3):347-76. doi:10.1007/s10555-016-9629-x PubMed PMID: 27392603; PubMed Central PMCID: PMC5035665.

122. Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV, Liu MC, et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. Ann Oncol. 1 juny 2020;31(6):745-59. doi:10.1016/j.annonc.2020.02.011 PubMed PMID: 33506766.

123. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med. setembre 2008;14(9):985-90. doi:10.1038/nm.1789 PubMed PMID: 18670422; PubMed Central PMCID: PMC2820391.

124. Leung F, Kulasingam V, Diamandis EP, Hoon DSB, Kinzler K, Pantel K, et al. Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: Fact or Fiction? Clin Chem. 1 agost 2016;62(8):1054-60. doi:10.1373/clinchem.2016.260331

125. Gauthier VJ, Tyler LN, Mannik M. Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. J Immunol. 1 febrer 1996;156(3):1151-6. doi:10.4049/jimmunol.156.3.1151

126. Celec P, Vlková B, Lauková L, Bábíčková J, Boor P. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. Expert Rev Mol Med. gener 2018;20:e1. doi:10.1017/erm.2017.12

127. Lee JS, Cho EH, Kim B, Hong J, Kim YG, Kim Y, et al. Clinical Practice Guideline for Blood-based Circulating Tumor DNA Assays. Ann Lab Med. 1 maig 2024;44(3):195-209. doi:10.3343/alm.2023.0389 PubMed PMID: 38221747; PubMed Central PMCID: PMC10813828.

128. Pascual J, Attard G, Bidard FC, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Ann Oncol. agost 2022;33(8):750-68. doi:10.1016/j.annonc.2022.05.520

129. González Á, Pérez Barrios C, Macher H, Sánchez-Carbayo M, Barco Sánchez A, Fernández Suárez A, et al. Recomendaciones preanalíticas para la obtención y análisis de ADN circulante a partir de sangre periférica. Recomendación (2018). Rev Lab Clínico. 1 juliol 2019;12(3):e40-6. doi:10.1016/j.labcli.2018.11.002

130. Shin S, Woo HI, Kim JW, Kim Y, Lee KA. Clinical Practice Guidelines for Pre-Analytical Procedures of Plasma Epidermal Growth Factor Receptor Variant Testing. Ann Lab Med. 1 març 2022;42(2):141-9. doi:10.3343/alm.2022.42.2.141

131. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, Goyal L, Levovitz C, Siravegna G, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. Nat Med. setembre 2019;25(9):1415-21. doi:10.1038/s41591-019-0561-9

132. Pereira B, Chen CT, Goyal L, Walmsley C, Pinto CJ, Baiev I, et al. Cell-free DNA captures tumor heterogeneity and driver alterations in rapid autopsies with pre-treated metastatic cancer. Nat Commun. 27 maig 2021;12(1):3199. doi:10.1038/s41467-021-23394-4

133. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. Nature. juny 2019;570(7761):385-9. doi:10.1038/s41586-019-1272-6

134. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. Sci Transl Med. 7 novembre 2018;10(466):eaat4921. doi:10.1126/scitranslmed.aat4921

135. Jones PA, Ohtani H, Chakravarthy A, De Carvalho DD. Epigenetic therapy in immune-oncology. Nat Rev Cancer. març 2019;19(3):151-61. doi:10.1038/s41568-019-0109-9

136. Ruiz-Bañobre J, Rodriguez-Casanova A, Costa-Fraga N, Bao-Caamano A, Alvarez-Castro A, Carreras-Presas M, et al. Noninvasive early detection of colorectal cancer by hypermethylation of the LINC00473 promoter in plasma cell-free DNA. Clin Epigenetics. 9 juliol 2022;14(1):86. doi:10.1186/s13148-022-01302-x PubMed PMID: 35810318; PubMed Central PMCID: PMC9271259.

137. Davalos V, Esteller M. Cancer epigenetics in clinical practice. CA Cancer J Clin. 2023;73(4):376-424. doi:10.3322/caac.21765

138. Illana FJ, Fernández-Galán E, Muñoz-Bravo JL, Valiña Amado L, García Martín C, González-Fernández C, et al. Circulating tumor DNA in patients with cancer: insights from clinical laboratory. Adv Lab Med Av En Med Lab. juny 2025;6(3):259-76. doi:10.1515/almed-2025-0010

139. Cai G, Cai M, Feng Z, Liu R, Liang L, Zhou P, et al. A Multilocus Blood-Based Assay Targeting Circulating Tumor DNA Methylation Enables Early Detection and Early Relapse Prediction of Colorectal Cancer. Gastroenterology. desembre 2021;161(6):2053-2056.e2. doi:10.1053/j.gastro.2021.08.054 PubMed PMID: 34487783.

140. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. Clin Chem. febrer 2008;54(2):414-23. doi:10.1373/clinchem.2007.095992 PubMed PMID: 18089654.

141. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. Gut. febrer 2014;63(2):317-25. doi:10.1136/gutjnl-2012-304149 PubMed PMID: 23408352; PubMed Central PMCID: PMC3913123.

142. Ma ZY, Chan CSY, Lau KS, Ng L, Cheng YY, Leung WK. Application of droplet digital polymerase chain reaction of plasma methylated septin 9 on detection and early monitoring of colorectal cancer. Sci Rep. 6 desembre 2021;11(1):23446. doi:10.1038/s41598-021-02879-8

143. Barták BK, Kalmár A, Péterfia B, Patai ÁV, Galamb O, Valcz G, et al. Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of *SFRP1, SFRP2, SDC2* , and *PRIMA1* in plasma samples. Epigenetics. 2 setembre 2017;12(9):751-63. doi:10.1080/15592294.2017.1356957

144. Chen X, Gole J, Gore A, He Q, Lu M, Min J, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. Nat Commun. 21 juliol 2020;11(1):3475. doi:10.1038/s41467-020-17316-z PubMed PMID: 32694610; PubMed Central PMCID: PMC7374162.

145. Mo S, Ye L, Wang D, Han L, Zhou S, Wang H, et al. Early Detection of Molecular Residual Disease and Risk Stratification for Stage I to III Colorectal Cancer via Circulating Tumor DNA Methylation. JAMA Oncol. 1 juny 2023;9(6):770-8. doi:10.1001/jamaoncol.2023.0425 PubMed PMID: 37079312; PubMed Central PMCID: PMC10119774.

146. Barault L, Amatu A, Siravegna G, Ponzetti A, Moran S, Cassingena A, et al. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of

treatment response in metastatic colorectal cancer. Gut. novembre 2018;67(11):1995-2005. doi:10.1136/gutjnl-2016-313372

147. Jin P, Kang Q, Wang X, Yang L, Yu Y, Li N, et al. Performance of a second-generation methylated SEPT9 test in detecting colorectal neoplasm. J Gastroenterol Hepatol. maig 2015;30(5):830-3. doi:10.1111/jgh.12855 PubMed PMID: 25471329.

148. Lieberman DA. Commentary: Liquid Biopsy for Average-Risk Colorectal Cancer Screening. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. juny 2024;22(6):1160-1164.e1. doi:10.1016/j.cgh.2024.01.034 PubMed PMID: 38552672; PubMed Central PMCID: PMC11265647.

149. Chung DC, Gray DM 2nd, Singh H, Issaka RB, Raymond VM, Eagle C, et al. A Cell-free DNA Blood-Based Test for Colorectal Cancer Screening. N Engl J Med. 14 març 2024;390(11):973-83. doi:10.1056/NEJMoa2304714 PubMed PMID: 38477985.

150. Shaukat A, Burke CA, Chan AT, Grady WM, Gupta S, Katona BW, et al. Clinical Validation of a Circulating Tumor DNA-Based Blood Test to Screen for Colorectal Cancer. JAMA. 1 juliol 2025;334(1):56-63. doi:10.1001/jama.2025.7515 PubMed PMID: 40455622; PubMed Central PMCID: PMC12131177.

151. van den Puttelaar R, Nascimento de Lima P, Knudsen AB, Rutter CM, Kuntz KM, de Jonge L, et al. Effectiveness and Cost-Effectiveness of Colorectal Cancer Screening With a Blood Test That Meets the Centers for Medicare & Medicaid Services Coverage Decision. Gastroenterology. juliol 2024;167(2):368-77. doi:10.1053/j.gastro.2024.02.012 PubMed PMID: 38552671; PubMed Central PMCID: PMC11193618.

152. Ladabaum U, Mannalithara A, Weng Y, Schoen RE, Dominitz JA, Desai M, et al. Comparative Effectiveness and Cost-Effectiveness of Colorectal Cancer Screening With Blood-Based Biomarkers (Liquid Biopsy) vs Fecal Tests or Colonoscopy. Gastroenterology. juliol 2024;167(2):378-91. doi:10.1053/j.gastro.2024.03.011 PubMed PMID: 38552670; PubMed Central PMCID: PMC12279009.

153. Ladabaum U, Mannalithara A, Schoen RE, Dominitz JA, Lieberman D. Projected Impact and Cost-Effectiveness of Novel Molecular Blood-Based or Stool-Based Screening Tests for Colorectal Cancer. Ann Intern Med. desembre 2024;177(12):1610-20. doi:10.7326/ANNALS-24-00910 PubMed PMID: 39467291; PubMed Central PMCID: PMC12302969.

154. Pan Z, Li G, Wu H, Pan F. Circulating tumor DNA methylation in colorectal cancer: a meta-analysis. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 1 gener 2026;578:120543. doi:10.1016/j.cca.2025.120543 PubMed PMID: 40784630.

155. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? Clin Chem. abril 2001;47(4):624-30. PubMed PMID: 11274010.

156. Liu Z, Zhang Y, Niu Y, Li K, Liu X, Chen H, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. PloS One. 2014;9(8):e103910. doi:10.1371/journal.pone.0103910 PubMed PMID: 25105762; PubMed Central PMCID: PMC4126674.

157. Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. Cancer Invest. 2005;23(4):338-51. doi:10.1081/cnv-58878 PubMed PMID: 16100946.

158. Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, Nicolini A, Kalousová M, Holubec L, et al. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. Int J Cancer. 1 juny 2014;134(11):2513-22. doi:10.1002/ijc.28384 PubMed PMID: 23852704; PubMed Central PMCID: PMC4217376.

159. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. Clin Chem. desembre 2008;54(12):e11-79. doi:10.1373/clinchem.2008.105601 PubMed PMID: 19042984.

160. Kim CG, Ahn JB, Jung M, Beom SH, Heo SJ, Kim JH, et al. Preoperative Serum Carcinoembryonic Antigen Level as a Prognostic Factor for Recurrence and Survival After Curative Resection Followed by Adjuvant Chemotherapy in Stage III Colon Cancer. Ann Surg Oncol. gener 2017;24(1):227-35. doi:10.1245/s10434-016-5613-5 PubMed PMID: 27699609.

161. Baile-Maxía S, Pimienta M, Sánchez-Ardila C, Castells A, Jover R, Ladabaum U. Systematic Review of Participation, Positivity, and Yield Over Time in Fecal Immunochemical Test-Based Organized Colorectal Cancer Screening Programs. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. 20 febrer 2026;S1542-3565(26)00135-7. doi:10.1016/j.cgh.2026.02.009 PubMed PMID: 41724209.

162. Malagón M, Alwers E, Oliver L, Ramió-Pujol S, Sánchez-Vizcaino M, Amoedo J, et al. Clinical performance study of a fecal bacterial signature test for colorectal cancer screening. PloS One. 2023;18(11):e0293678. doi:10.1371/journal.pone.0293678 PubMed PMID: 37992030; PubMed Central PMCID: PMC10664962.

163. Scimia M, Pepe F, Russo G, Malapelle U, Scimia S, Alfieri A, et al. Evaluation of Cell-Free DNA Long Fragments in the Triage of FIT+ Patients Enrolled in a Colorectal Cancer Screening Program: An Italian Prospective, Cross-Sectional Study. J Mol Pathol. 13 desembre 2024;5(4):533-43. doi:10.3390/jmp5040036

164. Nielsen HJ, Christensen IJ, Andersen B, Rasmussen M, Friis-Hansen LJ, Bygott T, et al. Serological biomarkers in triage of FIT-positive subjects? Scand J Gastroenterol. juliol 2017;52(6-7):742-4. doi:10.1080/00365521.2017.1299212 PubMed PMID: 28271924.

165. Petersen MM, Kleif J, Liggett J, Rasmussen M, Jørgensen LN, Vilandt J, et al. Development of an algorithm combining blood-based biomarkers, fecal immunochemical test, and age for population-based colorectal cancer screening. Gastrointest Endosc. desembre 2024;100(6):1061-1069.e3. doi:10.1016/j.gie.2024.06.015 PubMed PMID: 38908453.

166. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM Classification of Malignant Tumours. 8a ed. Chichester (UK): Wiley-Blackwell; 2017.

167. Roche Diagnostics. Cell-Free DNA Collection Tube (cfDNA), ref. 07785666001 [Internet]. Mannheim (DE): Roche Diagnostics. Disponible a: URL

168. Zymo Research. MAGicBead™ cfDNA Isolation Kit [Internet]. Irvine (CA): Zymo Research. Disponible a: URL

169. Thermo Fisher Scientific. Qubit™ dsDNA HS Assay Kit [Internet]. Waltham (MA): Thermo Fisher Scientific. Disponible a: URL

170. Díez-Villanueva A, Mallona I, Peinado MA. Wanderer, an interactive viewer to explore DNA methylation and gene expression data in human cancer. Epigenetics Chromatin. 2015;8:22. doi:10.1186/s13072-015-0014-8 PubMed PMID: 26113876; PubMed Central PMCID: PMC4480445.

171. Zymo Research. EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit: Instruction Manual [Internet]. Irvine (CA): Zymo Research. Disponible a: URL

172. Bio-Rad Laboratories. QuantaSoft™ / QuantaSoft™ Analysis Pro: User Guide [Internet]. Hercules (CA): Bio-Rad Laboratories. Disponible a: URL

173. Bio-Rad Laboratories. QX200™ Droplet Digital™ PCR System: User Guide [Internet]. Hercules (CA): Bio-Rad Laboratories. Disponible a: URL

174. Zymo Research. Human Methylated & Non-Methylated DNA Set (D5014): Product Datasheet [Internet]. Irvine (CA): Zymo Research. Disponible a: URL

175. Bio-Rad Laboratories. ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP): Instruction Sheet [Internet]. Hercules (CA): Bio-Rad Laboratories. Disponible a: URL

176. Roche Sequencing Solutions. AVENIO cfDNA Targeted Kit [Internet]. Pleasanton (CA): Roche Sequencing Solutions. Disponible a: URL

177. [Manufacturer]. Carcinoembryonic Antigen (CEA) Immunoassay [Internet]. [City (State/Country)]: [Manufacturer]. Disponible a: URL

178. [Manufacturer]. Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9) Immunoassay [Internet]. [City (State/Country)]: [Manufacturer]. Disponible a: URL

179. Monlab. FOB MonlabTest (Fecal Occult Blood Test) [Internet]. Barcelona (ES): Monlab. Disponible a: URL

180. Milbury CA, Zhong Q, Lin J, Williams M, Olson J, Link DR, et al. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. Biomol Detect Quantif. setembre 2014;1(1):8-22. doi:10.1016/j.bdq.2014.08.001

181. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 19 febrer 2014;6(224):224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094 PubMed PMID: 24553385; PubMed Central PMCID: PMC4017867.

182. Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, et al. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 19 setembre 2017;114(38):10202-7.

doi:10.1073/pnas.1704961114 PubMed PMID: 28874546; PubMed Central PMCID: PMC5617273.

183. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Res. 1 juliol 2001;29(13):E65-65. doi:10.1093/nar/29.13.e65 PubMed PMID: 11433041; PubMed Central PMCID: PMC55789.

184. Rand K, Qu W, Ho T, Clark SJ, Molloy P. Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. Methods. juny 2002;27(2):114-20. doi:10.1016/s1046-2023(02)00062-2 PubMed PMID: 12095268.

185. Brito-Rocha T, Constâncio V, Leite-Silva P, Carvalho-Maia C, Sequeira JP, Salta S, et al. Multi-cancer early detection via a DNA methylation multiplex ddPCR-based blood test. Int J Cancer. 1 setembre 2025;157(5):1006-19. doi:10.1002/ijc.35467 PubMed PMID: 40317486.

186. Menschikowski M, Jandeck C, Friedemann M, Nacke B, Hantsche S, Tiebel O, et al. Identification of rare levels of methylated tumor DNA fragments using an optimized bias based pre-amplification-digital droplet PCR (OBBPA-ddPCR). Oncotarget. 16 novembre 2018;9(90):36137-50. doi:10.18632/oncotarget.26315 PubMed PMID: 30546833; PubMed Central PMCID: PMC6281424.

187. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 18 juliol 2012;487(7407):330-7. doi:10.1038/nature11252 PubMed PMID: 22810696; PubMed Central PMCID: PMC3401966.

188. Strickler JH, Yoshino T, Stevinson K, Eichinger CS, Giannopoulou C, Rehn M, et al. Prevalence of KRAS G12C Mutation and Co-mutations and Associated Clinical Outcomes in Patients With Colorectal Cancer: A Systematic Literature Review. The oncologist. 2 novembre 2023;28(11):e981-94. doi:10.1093/oncolo/oyad138 PubMed PMID: 37432264; PubMed Central PMCID: PMC10628573.

189. Vessies DCL, Greuter MJE, van Rooijen KL, Linders TC, Lanfermeijer M, Ramkisoensing KL, et al. Performance of four platforms for KRAS mutation detection in plasma cell-free DNA: ddPCR, Idylla, COBAS z480 and BEAMing. Sci Rep. 15 maig 2020;10(1):8122. doi:10.1038/s41598-020-64822-7 PubMed PMID: 32415199; PubMed Central PMCID: PMC7229219.

190. Piao X, Yan Y, Yan J, Guan Y. Enhanced recognition of non-complementary hybridization by single-LNA-modified oligonucleotide probes. Anal Bioanal Chem. juliol 2009;394(6):1637-43. doi:10.1007/s00216-009-2821-x PubMed PMID: 19513703.

191. Nafa K, Hameed M, Arcila ME. Locked Nucleic Acid Probes (LNA) for Enhanced Detection of Low-Level, Clinically Significant Mutations. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2016;1392:71-82. doi:10.1007/978-1-4939-3360-0_8 PubMed PMID: 26843048.

192. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 novembre 2005;102(45):16368-73. doi:10.1073/pnas.0507904102 PubMed PMID: 16258065; PubMed Central PMCID: PMC1283450.

193. Cheng ML, Pectasides E, Hanna GJ, Parsons HA, Choudhury AD, Oxnard GR. Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: Clinical relevance and future directions. CA Cancer J Clin. març 2021;71(2):176-90. doi:10.3322/caac.21650 PubMed PMID: 33165928.

194. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. Nat Rev Cancer. abril 2017;17(4):223-38. doi:10.1038/nrc.2017.7 PubMed PMID: 28233803.

195. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. Nature. maig 2017;545(7655):446-51. doi:10.1038/nature22364

196. Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, Leiszter K, et al. Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. PloS One. 2014;9(12):e115415. doi:10.1371/journal.pone.0115415 PubMed PMID: 25526039; PubMed Central PMCID: PMC4272286.

197. Duffy MJ. Clinical uses of tumor markers: a critical review. Crit Rev Clin Lab Sci. juny 2001;38(3):225-62. doi:10.1080/20014091084218 PubMed PMID: 11451209.

198. Issa JP. Aging and epigenetic drift: a vicious cycle. J Clin Invest. gener 2014;124(1):24-9. doi:10.1172/JCI69735 PubMed PMID: 24382386; PubMed Central PMCID: PMC3871228.

199. Afzal A, Aranan YS, Roberts T, Covington J, Vidal L, Ahmed S, et al. Diagnostic accuracy of the faecal immunochemical test and volatile organic compound analysis in detecting colorectal polyps: meta-analysis. BJS Open. 30 desembre 2024;9(1). doi:10.1093/bjsopen/zrae154 PubMed PMID: 39972538; PubMed Central PMCID: PMC11839406.

200. Myśliwiec P, Choromanska B, Dadan J. Markers of metastatic colorectal cancer. Przeglad Gastroenterol. 2020;15(2):94-7. doi:10.5114/pg.2019.84848 PubMed PMID: 32550940; PubMed Central PMCID: PMC7294972.

201. Tan E, Gouvas N, Nicholls RJ, Ziprin P, Xynos E, Tekkis PP. Diagnostic precision of carcinoembryonic antigen in the detection of recurrence of colorectal cancer. Surg Oncol. març 2009;18(1):15-24. doi:10.1016/j.suronc.2008.05.008 PubMed PMID: 18619834.

202. Galleri® Test [Internet]. [citat 1 abril 2026]. Multi Cancer Blood Test | Galleri® for Healthcare Providers. Disponible a: https://www.galleri.com/hcp

203. Rodriguez-Casanova A, Costa-Fraga N, Bao-Caamano A, López-López R, Muinelo-Romay L, Diaz-Lagares A. Epigenetic Landscape of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. Front Cell Dev Biol. 2021;9:622459. doi:10.3389/fcell.2021.622459 PubMed PMID: 33614651; PubMed Central PMCID: PMC7892964.

204. Lockwood CM, Merker JD, Bain E, Compton C, Grossman RL, Johann D, et al. Towards Preanalytical Best Practices for Liquid Biopsy Studies: A BLOODPAC Landscape Analysis. Clin Pharmacol Ther. gener 2025;117(1):28-33. doi:10.1002/cpt.3416 PubMed PMID: 39164947; PubMed Central PMCID: PMC11652819.

205. Weber S, Spiegl B, Perakis SO, Ulz CM, Abuja PM, Kashofer K, et al. Technical Evaluation of Commercial Mutation Analysis Platforms and Reference Materials for Liquid Biopsy Profiling. Cancers. 16 juny 2020;12(6). doi:10.3390/cancers12061588 PubMed PMID: 32560092; PubMed Central PMCID: PMC7352370.

206. Schrag D, Beer TM, McDonnell CH 3rd, Nadauld L, Dilaveri CA, Reid R, et al. Blood-based tests for multicancer early detection (PATHFINDER): a prospective cohort study. Lancet Lond Engl. 7 octubre 2023;402(10409):1251-60. doi:10.1016/S0140-6736(23)01700-2 PubMed PMID: 37805216; PubMed Central PMCID: PMC11027492.

207. Adler A, Geiger S, Keil A, Bias H, Schatz P, deVos T, et al. Improving compliance to colorectal cancer screening using blood and stool based tests in patients refusing screening colonoscopy in Germany. BMC Gastroenterol. 17 octubre 2014;14:183. doi:10.1186/1471-230X-14-183 PubMed PMID: 25326034; PubMed Central PMCID: PMC4287474.

Anexos

Anexo I

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UNA COLECCIÓN

Título de la Línea de Investigación: Estudio de biomarcadores en cáncer

Responsable de la Colección: Francisco José Illana Cámara

Servicio: Bioquímica

Centro: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

INTRODUCCION:

Nos dirigimos a usted para solicitarle su autorización para incorporar en una colección el material biológico que se le ha extraído y la información clínica asociada, con el fin de que pueda ser utilizado en investigación biomédica.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, el Real Decreto 1716/2011 y sus normas de desarrollo, la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales, y el Reglamento (UE) General de Protección de Datos 2016/679, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y tomar la decisión que crea conveniente. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

Su colaboración es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento

posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO:

En el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau se le ha extraído una muestra de sangre con ocasión de un proceso diagnóstico y/o terapéutico o de un estudio de investigación. De esta muestra se ha extraído además material hereditario (ADN, ARN).

Habitualmente, sobra parte de estas muestras después de estos procesos y la normativa obliga a que sean destruidas al cabo de un tiempo.

En el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, al igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los individuos, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de los individuos o donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar en su diagnóstico y/o tratamiento.

Con la finalidad de poder seguir avanzando en el conocimiento de la enfermedad o proceso que usted padece se ha considerado conveniente solicitar su consentimiento para donar parte de la muestra excedente a una COLECCIÓN (conjunto ordenado de muestras biológicas) con el objeto de que pueda ser conservada y destinada a futuras investigaciones biomédicas relacionadas con la enfermedad o proceso descritos en la línea de investigación. Asimismo, se solicita su consentimiento para poder recoger la información clínica asociada procedente de su historia clínica.

¿CUÁL ES LA FINALIDAD DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN?

La finalidad de la presente línea de investigación es desarrollar e implementar pruebas no invasivas basadas en la detección de ctDNA para su aplicación en la detección precoz y seguimiento de diversos tipos de cáncer.

Francisco J. Illana Cámara, responsable de la presente colección, tendrá a su disposición toda la información sobre los proyectos de investigación en los que utilice su/s muestra/s.

La/s muestra/s que usted done sólo podrá/n ser utilizada/s para la finalidad descrita previamente. La utilización de la/s muestra/s biológica/s para una finalidad distinta a la descrita habrá de ser expresamente autorizada por usted en un nuevo documento de consentimiento.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE DONAR UNA MUESTRA?

La donación de muestras para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad.

Usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La muestra así recogida no podrá ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales, pero siempre garantizando el beneficio de la salud de la población.

Su colaboración en esta donación es completamente voluntaria: Si usted decide no donar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con los equipos médicos que le atiendan no se verá afectada. La donación de su muestra no supone ningún gasto extra.

¿CUÁLES SON LOS POSIBLES INCONVENIENTES VINCULADOS CON LA DONACIÓN, OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE LA MUESTRA?

La donación, obtención y utilización de su/s muestra/s biológicas no le ocasionarán molestias adicionales. La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.

Si acepta colaborar, también debe saber que se accederá a su historia clínica para recoger información relativa al proceso o enfermedad asociada a la línea de investigación. Además, es posible que el responsable de la colección pueda ponerse en contacto con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales.

La presente colección de muestras biológicas y la información clínica asociada se custodiarán en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados por los Comités de Ética.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud o la de sus familiares, derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica. En ese caso, usted tendrá la facultad de tomar una decisión en relación con su comunicación.

¿CUAL ES EL DESTINO DE LA MUESTRA?

Con la firma de este consentimiento, usted autoriza al Responsable de la Colección para la investigación, almacenamiento y utilización de sus datos clínicos relevantes y de su muestra biológica con objeto de poder ser utilizados en un futuro para realizar estudios en la línea de investigación descrita.

Tanto las muestras como los datos clínicos relevantes serán transferidos de manera anonimizada o codificada, según la opción que usted manifieste expresamente. Si decide no anonimizar las muestras, sólo el Responsable de la Colección podrá relacionar estos datos con usted.

Los resultados de futuros estudios podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniendo siempre una estricta confidencialidad sobre su identidad.

Si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona, puede optar por su conservación anonimizada.

La utilización de la muestra biológica para una finalidad distinta a la descrita habrá de ser expresamente autorizada por usted en un nuevo documento de consentimiento.

Una vez finalizada la línea de investigación, usted puede elegir si desea que se destruya la muestra, que la muestra sea anonimizada para usos posteriores, que sea cedida a un biobanco, o que sea integrada en una colección para una línea de investigación relacionada en la que podrá ser utilizada por un tercero.

¿PUEDO TENER ACCESO A LAS MUESTRAS Y/O LOS RESULTADOS DE SU ANÁLISIS?

Usted tiene derecho a conocer los resultados de sus análisis, así como los datos genéticos clínicamente relevantes que se obtengan a partir del análisis futuro de las muestras donadas, siempre que así lo desee y lo solicite.

Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su salud o la de su familia. Le corresponderá a usted decidir si quiere o no recibir esta información.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

También debe saber que la muestra estará disponible si usted la requiere por motivos de salud.

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el responsable de la colección podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y los resultados globales de dichas investigaciones.

¿CÓMO SE PROTEGERÁN MIS DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD?

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales), el Reglamento (UE) General de Protección de Datos 2016/679, la legislación sanitaria y la relativa a la investigación biomédica, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tiene carácter estrictamente confidencial.

La identificación de las muestras biológicas de la colección será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el responsable de la colección podrá relacionar su identidad con los citados códigos.

Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizadas, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del archivo de datos de la colección. La persona responsable de la custodia es el responsable de la colección.

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como el derecho a limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, y solicitar una copia o traslado

a un tercero (portabilidad) de los datos que usted ha facilitado. Además, podrá obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose al responsable de la colección.

¿QUÉ OCURRE SI YA NO DESEO QUE MI MUESTRA ESTÉ EN LA COLECCIÓN?

En cualquier momento usted podrá revocar el consentimiento para utilizar las muestras obtenidas, pudiendo solicitar la destrucción o la anonimización de las mismas.

No obstante, los efectos de la revocación no se podrán extender a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma.

Si usted desea anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Responsable de la Colección.

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, en relación con este consentimiento.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.

Anexo II

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y DATOS CLÍNICOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN CONSERVADAS EN UNA COLECCIÓN

Nombre y apellidos del donante.....

DNI…… Edad.....

Persona del centro que informa.....

DNI……..

Responsable de la colección: Francisco J. Illana Cámara

Título de la Línea de Investigación: Estudio de biomarcadores en cáncer

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide donar su muestra en la presente colección para la línea de investigación en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja:

El abajo firmante autoriza al Responsable de la Colección a conservar y utilizar el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar así como los datos clínicos relacionados procedentes de su historia clínica, con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica asociados a la línea de investigación Estudio de biomarcadores en cáncer, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente.

Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Confirmo que:

- Autorizo que el excedente de material biológico que me ha sido extraído se utilice para investigación en los términos recogidos en la Hoja de Información

☐ SI ☐ NO

- Autorizo que el responsable de la colección o el personal autorizado por el mismo accedan a mi historia clínica para recoger información asociada en los términos recogidos en la Hoja de Información

☐ SI ☐ NO

- Deseo que una vez terminada la línea de investigación, la muestra biológica:

o Sea destruida ☐

o Sea anonimizada para usos posteriores ☐

o Se incorpore en el Biobanco del IIB Sant Pau ☐

- Deseo que se me comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para mi salud o la de mi familia

☐ SI ☐ NO

- Autorizo a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

☐ SI ☐ NO Teléfono o E-mail de contacto:……

…… ……

Firma del paciente Firma del personal autorizado

Fecha: Fecha:

Firmar 3 ejemplares: Investigador/Médico, Responsable de la Colección, Paciente

Anexo III

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y DATOS CLÍNICOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN CONSERVADAS EN UNA COLECCIÓN

POR EL DONANTE:

Yo, D./Dña ..... con DNI…….. anulo el consentimiento prestado en fecha..... de.....de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria a la colección del Responsable....., que doy por finalizada al día de hoy.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.: .....

Fecha:

POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:

Yo, D./Dña ..... con DNI ……., Como representante legal de D/Dña……, con DNI……, anulo el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria a la colección del Responsable ....., que doy por finalizada al día de hoy.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE LOS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.: .....

Fecha

Agradecimientos

Mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han contribuido al desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar, a mis directores de tesis. A la Dra. Josefina Mora, por su empuje constante a lo largo de todo este proyecto y por su ayuda para resolver las dificultades con determinación. Al Dr. Francisco Blanco, por la confianza depositada en mí desde el inicio y por sus consejos, siempre honestos y desinteresados. Gracias a ambos por animarme a emprender este camino y por guiarme durante todo el proceso.

A mis compañeras y compañeros del Servicio de Bioquímica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, por su ayuda, apoyo y ánimos durante esta etapa. De una forma u otra, todos habéis contribuido a que este camino haya sido mucho más fácil y enriquecedor. Mi agradecimiento particular a Assumpta, Vanesa, Rosa y, en especial, a Susana, por su implicación directa en la recogida y análisis de las muestras.

A los compañeros de los servicios de Patología Digestiva y de Epidemiología, especialmente al Dr. Gordillo y a la Dra. María Teresa Puig, por su implicación desde el inicio en el desarrollo de este estudio.

A la Fundación Josep Carreras, por hacer posible la adquisición de la plataforma de PCR digital, y al grupo del Dr. Josep Nomdedeu, por su colaboración y por facilitarnos el acceso a esta plataforma.

A la Fundación José Luis Castaño, por la concesión de la ayuda económica inicial, clave para la puesta en marcha de este proyecto.

Mi más sincero agradecimiento a todos los pacientes y participantes que aceptaron formar parte de este estudio de forma altruista. Sin su colaboración, este trabajo no habría sido posible.

Mi agradeciemiento personal a mis padres, por darme siempre la libertad de elegir mi camino y enseñarme que el esfuerzo, la constancia y la resiliencia te pueden llevar más lejos de lo que imaginas.

A mis hermanas y al resto de mi familia, por estar siempre presentes, incluso en la distancia.

A mis hijos, mi mayor orgullo y motivación para seguir creciendo cada día.

A Marta, por infinitas razones, pero, sobre todo, por enseñarme lo que de verdad importa.