



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES GENÉTICOS Y
MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PREDICTIVA DE LA
HISTORIA NATURAL Y RESPUESTA QUIMIOTERÁPICA DE
NEOPLASIAS COLORRECTALES

Óscar Murcia Pomares



Tesis **Doctorales**

UNIVERSIDAD de ALICANTE

Unitat de Digitalització UA

Unidad de Digitalización UA



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES GENÉTICOS Y
MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PREDICTIVA DE LA
HISTORIA NATURAL Y RESPUESTA QUIMIOTERÁPICA DE
NEOPLASIAS COLORRECTALES

ÓSCAR MURCIA POMARES

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tesis Doctoral

Septiembre 2019



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA –
FACULTAD DE CIENCIAS

UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES GENÉTICOS Y
MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PREDICTIVA DE LA
HISTORIA NATURAL Y RESPUESTA QUIMIOTERÁPICA DE
NEOPLASIAS COLORRECTALES

ÓSCAR MURCIA POMARES

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tesis presentada para aspirar al grado de:
DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE

en

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL Y APLICADA

Dirigida por:

RODRIGO JOVER MARTÍNEZ

El doctorando, Óscar Murcia Pomares, es beneficiario de un contrato Río Hortega otorgado por el Instituto de Salud Carlos III en la convocatoria 2018: CM18/00058

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

1. Vía serrada de carcinogénesis en cáncer colorrectal: mecanismos y marcadores moleculares. Implicaciones en el diagnóstico, prevención y tratamiento. PI11/2630
Instituto de Salud Carlos III
IP: Rodrigo Jover Martínez
2012-2014
2. Correlación entre la tinción inmunohistoquímica y MS-MLPA para el análisis de la inactivación de MGMT en cáncer colorrectal. UGP14/265
Instituto de Investigación Biomédica de Alicante (ISABIAL)
IP: Rodrigo Jover Martínez
2015-2016
3. Identificación de nuevos biomarcadores para la prevención del cáncer colorrectal. PI2013/01
Fundación Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)
IP: Rodrigo Jover Martínez
2013-2018



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A mi familia,
el mayor premio que puedo tener



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Agradecimientos

En esta escalada sin descanso que comenzó hace muchos años (primaria/secundaria – bachiller – universidad – especialidad – doctorado) las personas van y vienen, pero las más importantes siempre están. En esta última etapa de la escalada, hay mucha gente implicada y que de un modo u otro ha contribuido a que pueda depositar esta tesis doctoral. Por eso, pido perdón de antemano si me olvido de alguien. Del mismo modo, pido perdón a los que mencione, porque dos o tres líneas no les hará justicia ni por asomo para el agradecimiento que siento.

Es justo empezar por el ámbito profesional, puesto que la tesis va directamente implícita en ello. Agradecer primero tanto a **Maite Herráiz** como a **José Martín** el haber aceptado formar parte del tribunal de mi tesis. Y por supuesto, agradecer también a todo el servicio de **Aparato Digestivo del Hospital General de Alicante** la formación y enseñanzas que desinteresadamente me han ido aportando a lo largo de toda mi formación inicial como especialista. Concretamente, hay dos personas a las que he de dar gracias especialmente, por orden de aparición. La primera de ellas, **Enrique de Madaria**, porque supo ver a un R0 ambicioso con ganas de desarrollarse y porque me motivó desde un inicio encendiendo la mecha de la hoguera. La segunda de ellas, **Rodrigo Jover**, porque desde que apareció echó gasolina a esa hoguera brindándome todo tipo de oportunidades y alimentando esa motivación, artífice de mi implicación con la Asociación Española de Gastroenterología y director de mi tesis. Gracias a ambos de corazón. También agradecer y reconocer a las promociones de residentes que incluyen a **Carolina, Karina, José, Maryana, Sandra y Lucía**, porque me cuesta creer que a nivel personal pueda volver a haber un grupo de residentes tan bueno. Sois geniales.

Continuando por el ámbito profesional, pero más enfocado al laboratorio, dos personas más. **Miren**, porque, aunque llevemos varios años colaborando juntos, ha sido en estos últimos meses cuando más he aprendido de ti, además de ser una magnífica persona. Y **Alejandro**, porque lo cierto es que estos meses sin ti no habrían sido lo mismo. Ya fuera desparafinando, monitorizando, haciendo turismo por Galicia o un parón a media mañana, las horas de trabajo se han hecho más llevaderas. Acercándonos al ámbito personal, no puedo dejar de mencionar a mis compañeros y amigos de promoción de residencia: **Alberto, Belén, David, Jorge, Maribel, Nacho, Paula y Salva**, y por supuesto a sus respectivas parejas y resto de miembros del grupo “Supertodo”, fundado hace ya 5 años. Algunos de ellos llevan más de 5 e incluso 10 años de recorrido. La cantidad de horas juntos, compartiendo noches interminables (de guardia o fuera del hospital) hace merecer que

estas relaciones se mantengan para siempre, desde Tenerife a Madrid, desde Santiago a Alicante, pasando por Granada. Un fuerte abrazo a todos.

Mención aparte merecen mis amigos maristeños y todo el grupo “Nanomaristas”: **David, Bea, Eva, Fernando, Laura, Irene, Javi, Kike, Bea, Nuria, Guillermo (Peta), Silvia, Víctor y María**. 15 años es complicado resumirlos en tan poco espacio. Simplemente puedo decir a modo de resumen que me alegro de tener en mi vida a amigos como ellos, siendo parecidos y diferentes a la vez, viéndonos evolucionar en el tiempo, siempre ahí cuando se les necesita. Una suerte contar con gente como ellos. Gracias.

Por último, lo más importante para mí: **la familia**. Para quien me conozca, sabe que soy una persona familiar. La familia lo es todo para mí, siempre está ahí. Por tanto, agradecer a mis **tíos, primos y abuelos**, tanto los que están como los que no, y a otras personas que llevan años ya (**Marina**) haber formado y formar parte de mi vida aportando cada uno su esencia. Merecen mención especial 4 personas, para las que ni tomos enteros harían justicia, y son para mí lo mejor que tengo:

Patricia, mi Patri, porque su mera presencia y cariño tienen la capacidad de elevar exponencialmente mi ilusión, felicidad, motivación y ganas de vivir. Porque contigo mi motor alcanza todas las revoluciones posibles. Por las ganas inmensas de descubrir contigo. Porque tenemos toda la vida por delante. Te quiero.

A mi hermano, **Marcos**, porque es imposible definirlo. La persona con el corazón más bueno y puro que conozco, bueno a rabiar en todo lo que se proponga. Líder, amigo y hermano. Dudo que pueda existir una persona igual, dudo que pueda existir un hermano mejor con el que tener una relación así, que por supuesto perdurará para siempre. Te quiero.

A **mi madre** y a **mi padre**, porque son los primeros y a la vez últimos responsables de quien soy, de lo que soy, con todo el amor y cariño que me han dado. Me han enseñado a no rendirme, perseguir mis metas, ser bueno y educado, ambicioso y respetuoso. Son todo un ejemplo para mí, unas personas magníficas en infinidad de aspectos. Todo lo que diga de ellos es poco. Estaré en deuda con vosotros para siempre. Os quiero.

Abreviaturas

AAS: ácido acetil salicílico

AECC: Asociación Española Contra el Cáncer

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

Hb: hemoglobina

CAPOX: capecitabina-oxaliplatino

CEA: antígeno carcinoembrionario

CCR: cáncer colorrectal

CIMP: CpG island methylator phenotype (H: high; L: low)

CIN: chromosomal instability pathway

CMS: consensus molecular subtypes

Cols: colaboradores

DE: desviación estándar

DNA: deoxyribonucleic acid

EGFR: epidermal growth factor receptor

FOLFIRI: leucovorina + 5-FU + irinotecán

FOLFOX: leucovorina + 5-FU + oxaliplatino

5-FU: 5-fluoruracilo

FUOX: 5-FU + oxaliplatino

IHQ: inmunohistoquímica

IMC: índice de masa corporal

IMS/MSI: inestabilidad de microsatélites/microsatellite instability pathway

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

mIFL: irinotecan + bolo de 5-FU y leucovorina

miRNA: micro ribonucleic acid

MMR: mismatch repair

PCR: reacción en cadena de polimerasa

QT: quimioterapia

RIq: rango intercuartílico

ROC: receiver operating characteristic

SOHi: test inmunológico de sangre oculta en heces

Tc: linfocitos T citotóxicos

TNM: tumor-lymph nodes-metastasis

TSLE: tiempo de supervivencia libre de enfermedad

WHO: World Health Organization

VEGF: vascular endothelial growth factor

Vs: versus



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ÍNDICE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

<u>Resumen de la tesis doctoral</u>	17
SECCIÓN 1: SÍNTESIS	
<u>1.- Introducción al cáncer colorrectal</u>	21
<u>1.1.-Perspectiva clínica</u>	21
<u>1.1.1.-Epidemiología</u>	21
<u>1.1.2.-Etiología y factores de riesgo</u>	22
<u>1.1.3.-Diagnóstico y estadificación</u>	26
<u>1.1.4.-Tratamiento</u>	30
<u>1.2.-Perspectiva biológica-molecular</u>	36
<u>1.2.1.-Historia natural</u>	36
<u>1.2.2.-Vías carcinogénicas</u>	38
<u>2.- Biomarcadores con poder pronóstico y predictivo en el cáncer colorrectal</u>	45
<u>3.- Sistemas de clasificación del cáncer colorrectal basados en biomarcadores</u>	55
<u>4.- Hipótesis y Objetivos</u>	61
<u>5.- Material y métodos</u>	63
<u>6.1.- Estudio 1</u>	63
<u>6.2.- Estudio 2</u>	68
<u>6.- Resultados</u>	71
<u>7.1.- Estudio 1</u>	71
<u>7.2.- Estudio 2</u>	74
<u>7.- Discusión</u>	77

<u>8.- Referencias</u>	91
<u>SECCIÓN 2: TRABAJOS PUBLICADOS</u>	107
<u>SECCIÓN 3: TRABAJOS NO PUBLICADOS</u>	113
<u>SECCIÓN 4: CONCLUSIONES</u>	145
<u>Anexo 1</u>	149
<u>Anexo 2</u>	153



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Resumen de la Tesis Doctoral

El cáncer colorrectal (CCR) permanece hoy día como una de las neoplasias con mayor incidencia y mortalidad en España. Su etiología es multifactorial, influyendo alteraciones genéticas y/o epigenéticas por un lado y factores ambientales que incluyen a la dieta y ciertos hábitos tóxicos por otro. El diagnóstico de confirmación se lleva a cabo mediante el análisis anatomopatológico de una muestra tumoral obtenida a través de una colonoscopia, mientras que para el tratamiento curativo se dispone de la opción quirúrgica asociando o no quimioterapia y/o radioterapia, en función de la localización y estadiaje tumoral.

La carcinogénesis colorrectal se inicia en las células epiteliales colónicas, experimentando cambios que derivan desde una mucosa sana en la formación de pólipos. Muchas de estas neoformaciones benignas evolucionarán hacia la formación de un adenocarcinoma en caso de no ser extirpadas. Esta secuencia de acontecimientos, la denominada secuencia adenoma-carcinoma, se desarrolla a lo largo de varios años en la mayor parte de los casos. A día de hoy, se conocen 3 vías diferentes de carcinogénesis por las que tiene lugar esta secuencia adenoma-carcinoma: la vía de la inestabilidad cromosómica, la vía de inestabilidad de microsatélites y la vía serrada. Cada una posee alteraciones genéticas/epigenéticas diferentes, aunque en algunos casos se comparten. Visualizando en conjunto estas vías, existen cuatro marcadores al menos que han demostrado ejercer una influencia en la evolución tumoral: BRAF, KRAS, metilación aberrante (CIMP) e inestabilidad de microsatélites. En la presente tesis se pretende investigar si alteraciones a estos niveles puedan implicar pronósticos diferentes y respuesta a la quimioterapia.

El artículo 1 divide el CCR en 5 subtipos, según combinaciones genético-moleculares en los 4 marcadores comentados que concuerden con las vías carcinogénicas conocidas. En una muestra de casi 900 pacientes, se evaluó si dichas combinaciones conferían un pronóstico y una respuesta a quimioterapia estándar diferentes. Así, el subtipo 2, perteneciente a un subgrupo de pacientes con CCR de la vía serrada con mutación en BRAF y fenotipo metilador, exhibían la tasa de supervivencia más baja al final del seguimiento. Por el contrario, los pacientes con CCR del subtipo 5, familiares con inestabilidad de microsatélites, presentaban la más alta. El subtipo 3, y principalmente el subtipo 4, es decir,

los más frecuentes, mostraron una respuesta favorable a la quimioterapia. En el resto de subtipos dicho efecto no pudo ser valorado con fiabilidad por un tamaño muestral deficiente al tratarse de CCR con combinaciones genético/moleculares menos frecuentes. No obstante, a la luz de los resultados obtenidos parece pertinente dividir el CCR en subtipos con el fin de lograr un mejor manejo de estos pacientes.

El artículo 2 pretende evaluar la utilidad del marcador TFAP2E para predecir una falta de respuesta a la quimioterapia, en caso de hallarse metilado, en pacientes con CCR. Se incluyeron pacientes de una cohorte observacional y de un ensayo clínico, en total casi 800 pacientes. Los resultados mostraron que, en estadio metastásico, la presencia de metilación en TFAP2E no se correlacionaba con una mejor ni peor respuesta al tratamiento quimioterápico, mostrando una supervivencia global similar frente a los pacientes con CCR sin metilación. En estadios II y III, la cohorte observacional no mostró diferencias en términos de supervivencia libre de enfermedad al comparar pacientes con tumores metilados y no metilados en TFAP2E, tampoco al analizar ambos estadios por separado. Únicamente se objetivó en la cohorte clínica una peor supervivencia en pacientes con CCR estadio II y metilación en dicho gen.

En resumen, ambos artículos muestran que las alteraciones genéticas correspondientes a mutaciones en BRAF y KRAS, la inestabilidad de microsatélites y la metilación de ciertos genes pueden ser de gran utilidad a la hora de predecir la evolución natural de un paciente con CCR y su respuesta a fármacos. De este modo, queda patente el potencial papel que determinados biomarcadores puede ejercer a la hora de tomar decisiones en el manejo de estos pacientes.

Sección 1: SÍNTESIS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Introducción al cáncer colorrectal

1.1.-Perspectiva clínica

1.1.1.-Epidemiología

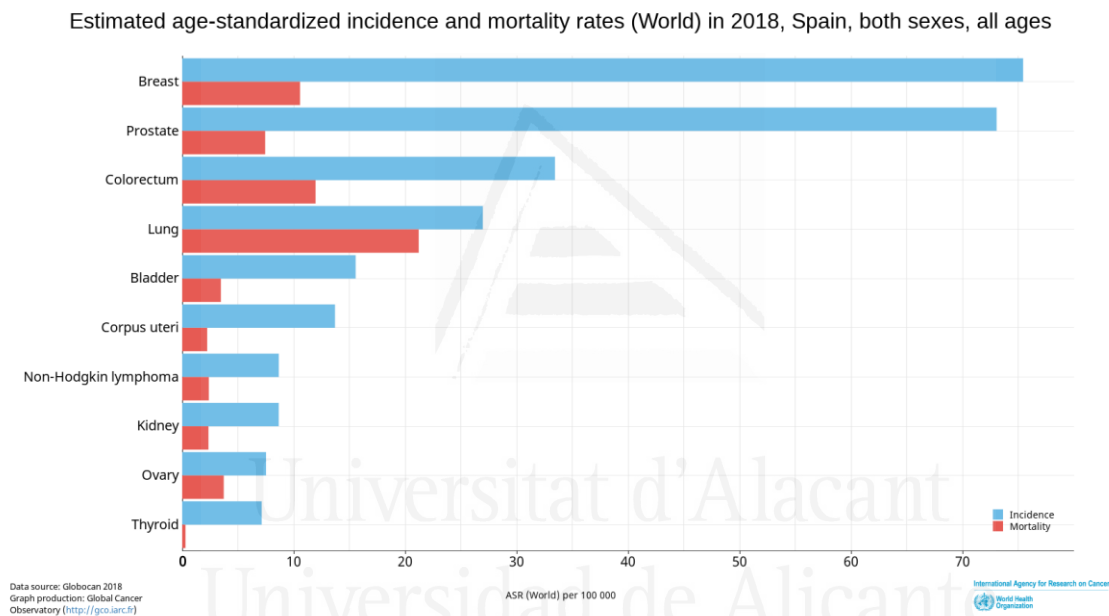
El cáncer se sitúa hoy en día como uno de los principales problemas de salud. Globalmente, la incidencia y mortalidad por cáncer se han incrementado en los últimos años. En el siglo XXI, se estima que se postule como la principal causa de muerte y principal barrera para incrementar la esperanza de vida. Datos proporcionados por la WHO (World Health Organization) en 2015 situaron al cáncer como la primera causa de muerte prematura, es decir por debajo de los 70 años, en la mayoría de países desarrollados.(1) Una de las principales causas de muerte por cáncer es la que atañe al cáncer colorrectal (CCR).

El CCR continúa siendo una de las neoplasias más frecuentes. Según los datos obtenidos de GLOBOCAN 2018, la prevalencia de CCR a nivel mundial se sitúa en segundo lugar, tanto en hombres como mujeres.(2) Teniendo en cuenta ambos sexos, se estima que la incidencia global fue de 1.850.000 nuevos casos en el pasado año. Pese a que en mujeres el CCR se sitúa en segundo lugar en incidencia tras el cáncer de mama, el número total de nuevos casos es mucho mayor en ellos (1.020.000 nuevos casos en 2018). Los avances terapéuticos han permitido un descenso de la mortalidad asociada en ambos sexos, estableciéndose en hombres como el cuarto cáncer con mayor número de muertes y en mujeres el tercero.

En España, la reciente y desigual implementación de programas de prevención de CCR, basados en test de sangre oculta en heces inmunológico (SOHi) y posteriores colonoscopias de cribado, impiden por el momento objetivar una clara disminución de nuevos casos, permaneciendo una incidencia al alza.(3) La influencia que puedan tener estos programas de prevención, unido al envejecimiento de la población y la creciente exposición a riesgos ambientales, serán los factores que principalmente determinen la futura tendencia en la incidencia del CCR en nuestro país. Por el momento, la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) estima que 1 de cada 20 hombres y 1 de cada 30 mujeres padecerá CCR a lo largo de su vida. La incidencia se incrementa notablemente a partir de los 50 años, con una media de edad al diagnóstico de 70-71 años y principalmente en varones. Teniendo en

cuenta ambos sexos, la incidencia de CCR estandarizada por edad sigue siendo la tercera más alta, 33.4 casos por cada 100.000 habitantes, con más de 21.000 nuevos casos diagnosticados en 2018. En la misma línea, aunque el número de personas fallecidas haya disminuido respecto a épocas pasadas, la tasa de mortalidad por CCR continúa siendo la segunda más alta por cáncer en España, 12 casos por cada 100.000 habitantes, produciendo el doble de fallecimientos en varones (Figura 1).

Figura 1. Riesgo de incidencia y mortalidad en España en 2018 para ambos sexos, estandarizada por edad.



1.1.2.- Etiología y factores de riesgo para el desarrollo de CCR

La etiología del CCR es multifactorial y variada, influyendo en su desarrollo diversos factores genéticos y también ambientales, tales como el estilo de vida y la dieta. Este proceso carcinogénico, de años de desarrollo, implica la transformación de células epiteliales colónicas sanas en células neoplásicas a través de una sucesión de alteraciones genéticas.(4) Estas alteraciones pueden ser inherentes al propio individuo si existe una herencia mendeliana o si existen mutaciones a nivel germinal heredadas de los progenitores, los denominados CCR familiares. Sin embargo, la mayor parte de los casos de

CCR tienen lugar debido a la presencia de mutaciones somáticas no heredadas, los denominados CCR esporádicos, y sobre los que se considera que ejercen un papel principal los factores ambientales.

En los últimos años, la evaluación del riesgo que suponen estos factores ambientales ha tenido cierto peso en la literatura científica. Mientras que algunos de ellos facilitarían el proceso carcinogénico, otros actuarían como factores protectores:

a) Dieta:

Los estudios acerca de la influencia que determinados alimentos puedan ejercer tienen una importante limitación, y es que es difícil aislar el efecto que un único alimento pueda producir sin considerar el resto. Aun así, diferentes trabajos de alta potencia estadística muestran un aumento marginalmente significativo del riesgo que el consumo de carne roja y carne procesada pueda ejercer posiblemente por la producción de hidrocarburos aromáticos durante la cocción a altas temperaturas.(5) Igualmente, se recomienda reducir el consumo de grasas en la dieta. A este respecto, una dieta con alto contenido graso no ha demostrado un aumento en la incidencia de CCR,(6) pero sí el hecho de padecer obesidad.(7) Por el contrario, existe cierto beneficio en el consumo de fruta y verdura en las cantidades recomendadas en una dieta equilibrada en la incidencia tanto de adenomas como de CCR, sin obtener un beneficio adicional por incrementar el consumo.(8)(9) En la misma línea, una dieta rica en pescado y fibra (grano entero, integral) y en productos lácteos, por su contenido cálcico, asocia en diferentes estudios un pequeño descenso en la incidencia de CCR, principalmente en colon.

Respecto a los micronutrientes, la principal evidencia científica disponible atañe a las vitaminas B y D, al folato y al calcio por su efecto protector sobre el desarrollo de CCR.(10) Este último, administrado en forma de suplementos, ha demostrado además una disminución en la recidiva de adenomas.(11) El resto de micronutrientes mencionados poseen un efecto protector sobre el desarrollo de CCR, pero este efecto no es a expensas de un incremento en la dosis, por lo que nuevamente, el contenido recomendado en una dieta equilibrada sería más que suficiente para obtener el beneficio esperado.(12)

b) Estilo de vida

Numerosos estudios observacionales han demostrado un aumento del riesgo de CCR de diferente magnitud según qué factores ambientales. Uno de los más estudiados y bien definidos es la obesidad. Se ha observado un aumento del riesgo de hasta el 16% en pacientes obesos respecto a los que no lo son en un metaanálisis de 13 estudios.(13) Este factor presenta además una relación dosis-respuesta, en la que a mayor aumento de peso mayor riesgo, observándose principalmente cuando la ganancia ponderal se da en el paso de la juventud a la edad adulta.(14) Este riesgo parece tener su origen en la obesidad a nivel abdominal y su relación con el síndrome metabólico, permaneciendo dicha relación dosis-respuesta en otros parámetros tales como el perímetro abdominal y el índice de masa corporal (IMC). Un metaanálisis y revisión sistemática de 17 estudios observaron que, independientemente del sexo, la mortalidad por CCR aumenta en pacientes con síndrome metabólico, a expensas principalmente de sus componentes diabético e IMC. De hecho, la diabetes se postula en sí misma como un factor de riesgo de CCR según los resultados de otro metaanálisis de hasta el 37%.(15) En la misma línea, la prevención de todos estos factores (obesidad, síndrome metabólico y sus componentes...) comporta una disminución clara del riesgo de desarrollar una neoplasia a este nivel. Este efecto preventivo podría conseguirse entre otros caminos a base de ejercicio. Se ha demostrado en un metaanálisis de 21 estudios observacionales que el ejercicio físico presenta una relación dosis-respuesta inversamente proporcional con el desarrollo de CCR.(16)

Otros dos factores de riesgo ambientales bien establecidos para el desarrollo de estos tumores son el tabaco y el alcohol. Respecto a este último, se ha observado un aumento del riesgo de CCR en aquellos sujetos con consumos mayores de 12,5g de alcohol diarios (consumos moderado-alto), así como de presentar mayor prevalencia de adenomas y pólipos serrados.(17) El tabaco también implica un aumento tanto de incidencia como de mortalidad por CCR en aquellos sujetos fumadores activos y exfumadores según los datos de un metaanálisis con más de 800.000 participantes, extendiéndose el riesgo también a la hora de presentar adenomas y pólipos serrados.(18)

c) Quimioprevención

Diversos fármacos han sido objeto de estudios observacionales e incluso de ensayos clínicos con motivo de evaluar su potencial papel preventivo en el CCR. Entre ellos, uno de los más estudiados es el ácido acetil salicílico (AAS). Un metaanálisis de estudios observacionales comprobó que el uso de este fármaco comportaba una disminución del riesgo de adenomas, CCR, metástasis y mortalidad, si bien los estudios eran heterogéneos y con los sesgos propios de estudios de casos y controles. En cambio, otro metaanálisis de 4 ensayos clínicos observó una disminución de la incidencia de adenomas a lo largo de 36 meses relacionada con la ingesta de AAS.(19) Si bien es cierto que ensayos clínicos posteriores han confirmado esta asociación, los estudios tienen como objetivo primario la reducción de mortalidad por causa cardiovascular. A este respecto, una revisión sistemática actualizada en 2016 de ensayos clínicos determinó una reducción de la mortalidad por CCR de hasta el 33% con el uso crónico de AAS, así como una disminución de la incidencia tras 10-19 años de empleo de dicho fármaco.(20)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) también han sido objeto de estudio. En una revisión sistemática de 15 ensayos clínicos con pacientes con CCR previo, se observó que estos fármacos (sin incluir el AAS), presentaban la menor incidencia de neoplasia avanzada metacrónica respecto a placebo. Si bien es cierto que en este trabajo el AAS presentaba un efecto preventivo de menor magnitud, era un fármaco mucho más seguro que los AINEs, que presentaban el peor perfil de seguridad.(21)

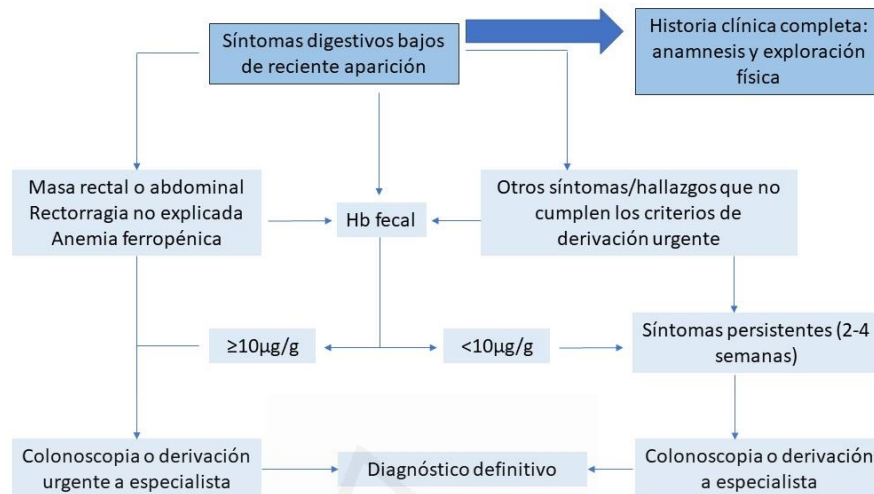
Diferentes metaanálisis observacionales han evaluado el papel quimiopreventivo de la metformina, objetivando una disminución del riesgo de adenoma y CCR.(22) Por último, los datos acerca de la prevención que las estatinas puedan ejercer no son concluyentes. En un trabajo que incluía un metaanálisis y 18 estudios con diseños diferentes, se observó que en los ensayos clínicos y estudios de cohortes no existía un menor riesgo con el uso de estos fármacos, y únicamente en 9 estudios de casos y controles existía una disminución del riesgo de hasta el 9%.(23)

1.1.3.- Diagnóstico y estadificación

El diagnóstico de CCR puede darse en varios contextos. Por una parte, aquellas situaciones en las que el paciente se encuentra asintomático y la exploración complementaria se realiza como parte de un programa de cribado poblacional, por antecedentes familiares de CCR o por cualquier otro motivo; y, por otro lado, aquellos casos en los que el paciente presenta síntomas relacionados con la existencia de un tumor a nivel colónico.

En este último caso, es imprescindible una correcta anamnesis y examen físico, incluyendo una exploración ano-rectal. Ante la presencia de síntomas tales como rectorragia y/o hematoquecia en ausencia de patología benigna ano-rectal, pérdida de peso no intencionada, alteración reciente del hábito intestinal, masa rectal o abdominal palpable o visualizada en un examen radiológico o anemia ferropénica sin causa justificada, se debe realizar una colonoscopia de manera urgente-preferente (aproximadamente 2 semanas a lo sumo) por sospecha de CCR. Los pacientes que no cumplan estos criterios deben ser sometidos a la prueba de sangre oculta en heces inmunológica (SOHi), y en caso de presentar un nivel de Hb fecal ≥ 10 ug/g de heces será pertinente realizarles una colonoscopia con el mismo grado de urgencia (Figura 2). Este nivel de corte se considera óptimo para evitar saturar las salas de endoscopia con pruebas innecesarias y a su vez para no pasar por alto pacientes que puedan albergar un tumor colorrectal.

Figura 2. Evaluación del paciente con síntomas digestivos bajos de reciente aparición. Adaptado de Cubiella J y cols. *Guía de práctica clínica. Diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal. Actualización 2018. Gastroenterol Hepatol. 2018.* Hb: hemoglobina.

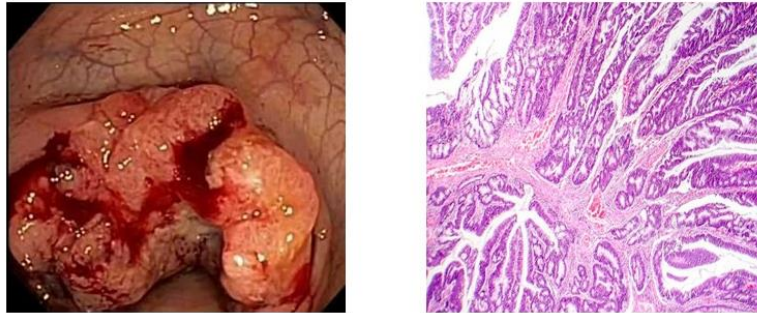


Por otro lado, en aquellos pacientes sin síntomas digestivos sospechosos que pertenezcan a una población de riesgo medio de CCR, se recomienda la realización bienal del test de SOHi entre los 50 y 75 años. En caso de resultado positivo, debería efectuarse una colonoscopia para despistaje tumoral. Existe cierta controversia en relación a la manera de proceder con individuos que tengan un familiar de primer grado con CCR. Tradicionalmente, se ha considerado que debían someterse a una colonoscopia a los 40 años o 10 años antes del diagnóstico de CCR en dicho familiar. Hoy día, esta recomendación se limita a personas con dos o más familiares de primer grado afectados de CCR. Varios estudios han determinado un riesgo similar entre los sujetos con un único familiar de primer grado con CCR comparado con el riesgo poblacional, por lo que en estos momentos se les recomienda la inclusión en el programa de test de SOHi bienal.

La prueba gold-estándar para el diagnóstico de CCR es la colonoscopia con toma de biopsias y posterior confirmación anatomopatológica (Figura 3). La colonoscopia presenta una alta sensibilidad y especificidad al permitir una visualización óptica in situ de la mucosa colónica. No obstante, en aquellos casos en los que la colonoscopia esté contraindicada o no pueda ser satisfactoria por cualquier motivo (mala limpieza reiterada, incapacidad

técnica de alcanzar el ciego, edad avanzada, comorbilidades...), se recomienda la realización de una colonografía-TAC.

Figura 3. Imágenes del cáncer colorrectal desde una óptica endoscópica (izquierda) y anatomopatológica (derecha).



La estadificación del CCR en el momento del diagnóstico es de especial importancia, pues es uno de los factores que marca el pronóstico del paciente. Además, tiene implicaciones a la hora de decidir el tratamiento óptimo según la extensión neoplásica. Aunque previamente se han empleado sistemas como el Duke, en estos momentos el estadio de pacientes con este tipo de tumores viene establecido por el sistema TNM (Tabla 1), donde el estadio I asocia el mejor pronóstico a 5 años y el estadio IV el peor.

Tabla 1. Estadiaje TNM del CCR. A) Definición para cada estadio T, N y M. B) Correspondencia TNM según las características del tumor.

A)

T	N	M
Tx: no se puede evaluar el tumor primario	Nx: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales	M0: sin evidencia de enfermedad metastásica
T0: no hay evidencia de tumor.	N0: no existe diseminación hacia los ganglios regionales	M1a: presencia de células tumorales a distancia del tumor primario, en una única localización.

Tis (carcinoma in situ): las células neoplásicas se encuentran en el epitelio o lámina propia, sin sobrepasarla.	N1a: presencia de células tumorales en 1 ganglio linfático regional.	M1b: presencia de células tumorales a distancia del tumor primario, en más de una localización.
T1: el tumor invade la submucosa	N1b: presencia de células tumorales en 2-3 ganglios linfáticos regionales.	M1c: presencia de células tumorales en la superficie peritoneal.
T2: el tumor invade la muscular propia	N1c: presencia de células neoplásicas en ganglios de tejidos adyacentes.	
T3: el tumor alcanza la capa subserosa	N2a: presencia de células tumorales en 4-6 ganglios linfáticos regionales.	
T4a: el tumor invade el peritoneo visceral	N2b: presencia de células tumorales en 7 o más ganglios linfáticos regionales	
T4: el tumor crece en otros órganos adyacentes		

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

B)

Estadío	Correspondencia TNM	Supervivencia global a 5 años (%)
0	Tis N0 M0	> 95
I	T1-2 N0 M0	74-93.2
Ila	T3N0M0	64.5-84.7
IIb	T4a N0 M0	51.6-79.6
IIc	T4b N0 M0	32.3-58.8
IIIa	T1-2 N1a-c M0 T1 N2a M0	73.1-83.4
IIIb	T3-4a N1a-c M0 T2-3 N2a M0	46.3-64.1

	T1-2 N2b M0	
IIIc	T4a N2a M0 T3-4a N2b M0 T4b N1-2 M0	8.0-44.3
IVa	Cualquier T y N, M1a	5.7-8.1
IVb	Cualquier T y N, M1b	
IVc	Cualquier T y N, M1c	

1.1.4.- Tratamiento

Dentro de las opciones de tratamiento se contempla la resección quirúrgica, el tratamiento quimioterápico, radioterápico y otras terapias dirigidas.

a) Cirugía

La cirugía es la única opción de tratamiento aplicada de manera electiva con una intención curativa en la mayor parte de los casos (exceptuando aquellos casos puntuales de intervenciones realizadas de manera urgente en caso de perforación u obstrucción...). Pretende la resección del tumor y de varios centímetros adyacentes de colon confiriendo márgenes de seguridad, realizando habitualmente sigmoidectomías, hemicolectomías izquierdas o derechas completas. También se realiza para llevar a cabo la resección de todo el paquete linfático primario y locorregional. Para los pacientes con cáncer de recto, el tipo de intervención quirúrgica vendrá dado por la distancia a la que se sitúe el tumor respecto al ano y el grado de afectación de tejidos adyacentes, pudiendo optar por la resección transanal local, resección anterior baja, proctectomía total o resección abdominoperineal según el caso.

La decisión acerca de la realización de cirugía abierta vs laparoscópica ha sido evaluado mediante ensayos clínicos multicéntricos. En uno de ellos, con más de 800 pacientes, se comprobó que en aquellos con cirugía laparoscópica la tasa de recidiva (16% vs 18%) y la tasa de supervivencia global (86% vs 85%) era similar a los 4,5 años que en los pacientes

intervenidos mediante cirugía abierta. La estancia media hospitalaria fue incluso un día menor en aquellos con cirugía laparoscópica (5 vs 6 días).(24)

La cirugía en el CCR no se reserva únicamente para el tumor primario, sino que en ciertas ocasiones se lleva a cabo la resección de metástasis, principalmente hepáticas. En aquellos pacientes con una reserva hepática funcional adecuada, ausencia o limitada enfermedad extrahepática, ausencia de compromiso vascular importante y ante un número limitado de lesiones, se puede plantear una resección completa de estas metástasis. Las tasas de supervivencia a 5 años tras la resección completa oscilaban entre un 25-40%. No obstante, en ciertas ocasiones en que inicialmente la lesión no es resecable, es posible plantear una resección diferida si existe una repuesta adecuada a la quimioterapia neoadyuvante que convierta la lesión en potencialmente resecable.(25)(26) Obviamente, la toma de decisiones se realizará en el seno de un comité multidisciplinar e individualizando según el caso.

b) Quimioterapia

Se trata de una terapia que, de modo general, se administra complementariamente a la cirugía cuando la intención es curativa, mientras que la administración como terapia única tiene habitualmente, salvo contados casos, un fin paliativo. Como terapia con intención curativa puede administrarse previamente (neoadyuvante) o posteriormente (adyuvante) a la cirugía, según las características de la enfermedad. Su uso es habitual en estadios III y IV, existiendo gran controversia sobre su empleo en estadio II. A este respecto, un metaanálisis de series de casos observó un incremento en la supervivencia de apenas el 2% cuando la quimioterapia se administra de manera adyuvante a la cirugía respecto a cuando no se administra.(27) La American Society of Clinical Oncology determinó que la quimioterapia adyuvante en estadio II debía utilizarse únicamente en casos muy concretos, en los que la probabilidad de recidiva fuera mayor, es decir, estadio II de mal pronóstico: enfermedad T4, afectación de peritoneo visceral, grado indiferenciado histológico y muestra inadecuada de ganglios linfáticos. No obstante, cabe decir que en último término cada caso deberá ser individualizado por parte del médico responsable.(28)

En estadíos III y IV, existen diversos fármacos que ha probado su utilidad:

--**5-Fluoruracilo (5-FU)**: se trata del fármaco empleado actualmente para el CCR con más antigüedad en su uso. Hoy día se emplea en combinación con leucovorina, un derivado del ácido fólico, por el aumento en la efectividad que conlleva. Varios estudios han demostrado su eficacia en estadio III, entre ellos destacan tres ensayos clínicos aleatorizados en los que, contando con 4000 pacientes, se comprobó que la mortalidad cuando se administraba 5-FU+leucovorina descendía del 33% hasta el 22% a los 3 años.(29–31) La duración de los regímenes se establece en 6-8 semanas o 24, sin hallar diferencias en cuanto a la efectividad según se administren dosis altas o bajas de leucovorina.(32,33) En estadio IV, la eficacia que pueda tener se reserva a meros aumentos leves de supervivencia global y de la calidad de vida, con una mediana de supervivencia de 12 meses cuando se da como tratamiento paliativo.(34)

--**Capecitabina**: se trata de una fluoropirimidina que, tras varias reacciones enzimáticas, se convierte en 5-FU en el interior de las células tumorales. Varios estudios han demostrado la equivalencia clínica entre este fármaco y el 5-FU en estadio III, entre ellos un estudio multicéntrico europeo en el que la supervivencia libre de enfermedad a 3 años fue similar, con aumento en la frecuencia de efectos adversos como eritrodermia palmoplantar e hiperbilirrubinemia y con disminución de otros como náuseas, vómitos, estomatitis, alopecia y neutropenia.(35) En estadio IV, la eficacia es similar a 5-FU+leucovorina.(36)

--**Oxaliplatino**: su eficacia ha sido probada en pacientes con CCR en estadíos III y IV cuando se da en combinación con 5-FU y leucovorina (régimen FOLFOX). El estudio MOSAIC determinó en más de 2000 pacientes con CCR estadio III que si bien la toxicidad era similar cuando se añadía oxaliplatino, la supervivencia global a 6 años era leve pero significativamente mayor cuando se empleaba FOLFOX (67% vs 73%).(37) La combinación de oxaliplatino con capecitabina también ha sido evaluada. Así, en un ensayo clínico aleatorizado de 1900 pacientes con CCR estadio III, la supervivencia libre de enfermedad a

7 años en aquellos que recibieron esta combinación (CAPOX) fue significativamente mayor que aquellos que recibieron 5-FU+leucovorina (63% vs 56%), por lo que este régimen se considera aceptable como primera línea en pacientes con CCR estadio III.(38) En pacientes con CCR en estadio IV se ha evaluado la combinación de oxaliplatino con capecitabina (CAPOX) o con 5-FU (FUOX), sin observar diferencias en cuanto a tiempo de supervivencia libre de enfermedad.(39)

--**Irinotecán:** en CCR estadio IV ha sido probada su eficacia en combinación con otros fármacos, según 3 estudios. En ellos, se comparaba el tratamiento con 5-FU+leucovorina según se añadiese irinotecán u oxaliplatino. En uno de ellos se observó una mayor supervivencia global y tiempo libre de enfermedad en aquellos tratados mediante irinotecán+5-FU+leucovorina, mientras que en dos estudios posteriores se evaluó el régimen FOLFIRI vs FOLFOX sin observar diferencias de supervivencia ni ausencia de enfermedad. A raíz de estos trabajos, se consideran aptos como tratamiento de primera línea ambas combinaciones de fármacos para el tratamiento de CCR metastásico.(40–42)

c) Otras terapias dirigidas

--**Bevacizumab:** se trata de un anticuerpo monoclonal parcialmente humanizado que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se ha probado que es aceptable añadirlo a FOLFOX o FOLFIRI como tratamiento de primera línea en el CCR metastásico. A destacar dos estudios, probándose en uno de ellos que añadir bevacizumab a pacientes con FOLFOX vs FOLFOX sin combinación producía una mejoría en la supervivencia global y el tiempo libre de enfermedad; y una mejoría de la supervivencia global en pacientes con FOLFIRI+bevacizumab vs régimen de irinotecán+5-FU en infusión intravenosa+leucovorina en bolo (mIFL)+bevacizumab en el otro.(43,44)

--**Aflibercept:** con el mismo mecanismo de acción que el anterior, se emplea como terapia de segunda línea en el CCR metastásico. En un ensayo que comparó FOLFIRI + aflibercept vs FOLFIRI + placebo, se observó que la primera combinación presentaba un aumento tanto de la supervivencia global como del tiempo de supervivencia libre de enfermedad.(45)

--**Ramucirumab**: se trata de un anticuerpo monoclonal completamente humanizado contra el receptor 2 del VEGF. Se considera, en combinación con FOLFIRI, que es un tratamiento de segunda línea aceptable tras una primera línea de FOLFOX+bevacizumab en el que existe una progresión de la enfermedad, consiguiendo aumentar la supervivencia global y libre de enfermedad.(46)

--**Cetuximab**: es un anticuerpo monoclonal parcialmente humanizado contra el receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR), impidiendo la cascada molecular que inicia con la señalización tirosin-kinasa dependiente. Por tanto, CCR con mutaciones en genes de la vía MAPK-kinasa, como KRAS, serán insensibles al efecto de dicho fármaco. Se ha probado en adición a otras terapias de primera línea, por ejemplo, FOLFIRI, observando una mejoría de la supervivencia libre de enfermedad respecto a no añadirlo en un estudio aleatorizado con 1200 pacientes con CCR estadio IV.(47)

--**Panitumumab**: es un anticuerpo completamente humanizado contra el EGFR. Ha sido probada su utilidad tanto en monoterapia como en combinación con otros tratamientos en pacientes con CCR metastásico. En un ensayo clínico que evaluó el uso en primera línea de FOLFOX vs FOLFOX + panitumumab se observó un aumento de supervivencia global y libre de enfermedad en este último caso, pero únicamente en aquellos pacientes sin mutación en KRAS, presentando una peor supervivencia y mayor toxicidad cuando estaba presente. En la misma línea, en otro estudio se asignó a recibir FOLFIRI sólo o en combinación con panitumumab tras fracaso a 5-FU+leucovorina, presentando una mayor supervivencia libre de enfermedad cuando se añadía la combinación.(48,49)

-**Regorafenib**: se trata de un inhibidor tirosin-kinasa que ha sido probado tras el fracaso a otros tratamientos previos en CCR estadio IV. Cuando se comparó vs placebo, se produjo un aumento de la supervivencia global en un estudio con 760 pacientes.(50)

--**Pembrolizumab**: es un anticuerpo que actúa frente a la diana PD-1, presentando respuestas óptimas en pacientes con CCR metastásico con inestabilidad de microsatélites.(51) La supervivencia de estos pacientes es claramente superior a la observada en aquellos con CCR metastásico sin inestabilidad de microsatélites, reservándose por tanto para este pequeño subgrupo de pacientes.

d) Radioterapia

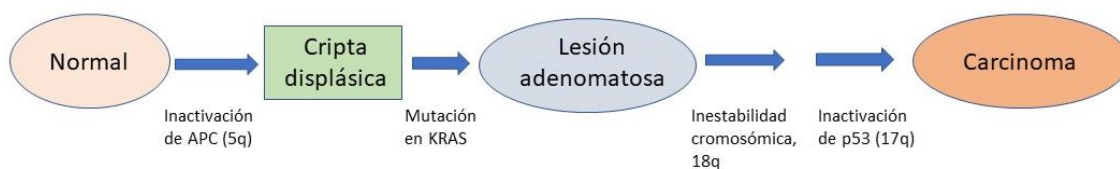
Su principal escenario se sitúa en el cáncer de recto, ya que son muy pocos escenarios en los que según estudios unicéntricos y retrospectivos tiene su aplicabilidad en el cáncer de colon (tumores inmóviles, T4, metástasis óseas o cerebrales, enfermedad residual tras la resección...). Así, en el cáncer de recto estadios II y III el tratamiento con radioterapia suele darse en combinación con quimioterapia de forma neoadyuvante para permitir en un segundo tiempo una cirugía más efectiva en la eliminación de la enfermedad. Esta radioterapia suele darse de forma externa, reservando la radioterapia intracavitaria para aquellos casos con tumores de pequeño tamaño en pacientes que no puedan ser sometidos a cirugía mayor.

1.2. Perspectiva biológica-molecular

1.2.1 Historia natural

La historia natural del CCR comprende una serie de etapas sucesivas, que se solapan en cierta medida unas con otras y que finalmente desembocan en la aparición de un tumor. Inicialmente, las células epiteliales colónicas sanas experimentan una serie de alteraciones genéticas que, de no repararse o activar señales apoptóticas para dichas células, desencadenan la aparición de criptas aberrantes focales no displásicas primero, después displásicas y finalmente de lesiones benignas denominadas pólipos. Estos pólipos suelen presentarse habitualmente en sus etapas más precoces como pequeños nódulos que dependen de la mucosa colónica. Posteriormente y, en un proceso que puede conllevar años de duración, algunas de estas lesiones benignas crecen y evolucionan a lesiones avanzadas, con alto potencial de degeneración maligna. Un reciente estudio observacional muestra que después de 3 años de seguimiento, aproximadamente la mitad de los pólipos de entre 6 y 9 mm evoluciona a lesiones premalignas, el 40% se mantienen estables y hasta en el 10% de los casos la regresión sería posible.(52) Las lesiones avanzadas, en caso de no ser extirpadas, evolucionarán hacia una neoplasia colónica maligna. Esta secuencia completa fue descrita por primera vez en 1951 por Jackman y Mayo, y recuperada en 1990 por Fearon y Vogelstein, siendo bautizada como secuencia “adenoma-carcinoma” (Figura 4).(53,54)

Figura 4. Secuencia adenoma-carcinoma colorrectal, con algunos de los eventos genéticos acontecidos en cada etapa.

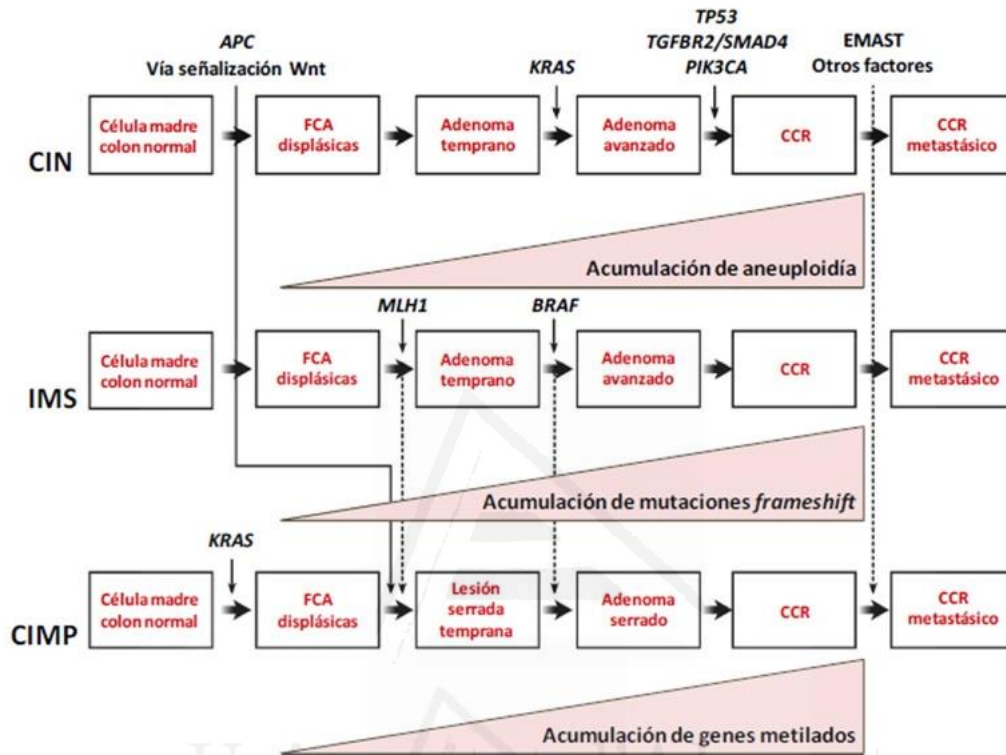


Todo este proceso evolutivo morfológico posee de manera subyacente un conjunto de eventos genético-moleculares carcinogénicos iniciales a los que se van sumando muchos

otros. De esta manera, aunque inicialmente existan unas alteraciones concretas sobre la mucosa sana, a largo de la historia natural del CCR se van acumulando otras alteraciones genéticas y/o epigenéticas que desembocarán en la aparición del CCR. Que se acumulen unas u otras tendrá implicaciones evolutivas del tumor y pronósticas para el paciente. A día de hoy, las lesiones benignas desde las que se originan los tumores colorrectales se pueden dividir en dos grupos: pólipos adenomatosos (adenomas) o pólipos/lesiones serradas, siendo los pólipos hiperplásicos los precursores de éstas últimas. Aunque no sea correcto vincular un tipo morfológico a unas alteraciones genéticas determinadas, es cierto que existe cierta asociación. Del mismo modo, la denominada secuencia adenoma-carcinoma no sólo se limita a lesiones adenomatosas, sino que también es aplicable a las serradas.

Las diferentes etapas evolutivas hasta el desarrollo de CCR no siguen un curso lineal en el que cada etapa tiene una duración similar a la previa o a la consecuente, sino que se dan fenómenos de aceleración de una fase a otra.(55) Así, los eventos iniciales desde la presencia de células epiteliales sanas hasta la producción de una lesión polipoidea en estadio inicial se estima que puede durar entre 30-60 años, según la vía carcinogénica subyacente. A esta etapa de “iniciación tumoral” le sucede otra de “progresión tumoral”. Esta etapa presenta una aceleración mayor, con intervalos que pueden variar entre 1-20 años, y se caracteriza por la acumulación progresiva de mutaciones que harán proliferar unos clones celulares específicos dentro del pólipo, en detrimento de aquellos clones celulares que no posean dichas mutaciones. Resultado de este proceso, existirá un pólipo heterogéneo genéticamente que albergará aquel clon celular que hará progresar dicha lesión hasta producir una neoplasia. Aún más veloz es la última fase, en la que ya se ha establecido el carcinoma. Comprende los eventos que acontecen desde la aparición de células neoplásicas hasta la producción de metástasis, y su duración se estima entre 0-2 años. Esta aceleración progresiva observada en las distintas etapas de esta secuencia adenoma-carcinoma podría explicarse por la acumulación exponencial de eventos mutacionales y epigenéticos (Figura 5).

Figura 5. Secuencia adenoma-carcinoma para las tres vías carcinogénicas del cáncer colorrectal. Adaptado de “Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2015”; FCA: cripta aberrante focal; CCR: cáncer colorrectal; CIN: inestabilidad cromosómica; IMS: inestabilidad de microsatélites; CIMP: fenotipo metilador.



1.2.2. Vías carcinogénicas

La comprensión cada vez mayor de la biología subyacente al CCR ha permitido diferenciar varios subtipos tumorales. En todos ellos, existe una inactivación de ciertos genes supresores de tumores (p53, APC, SMAD, DCC, genes MMR, etc...) y por otra parte una activación de oncogenes (a destacar KRAS, BRAF, CTNBB1, COX-2, MYC y CCND1), que determinarán un subtipo tumoral concreto.⁽⁵⁵⁾ A día de hoy, la búsqueda de un sistema de clasificación del CCR basado en la vía carcinogénica y con implicaciones pronósticas ha permitido diferenciar tres diferentes subtipos de tumores colorrectales según la vía subyacente:

- Vía de la inestabilidad cromosómica (CIN pathway)

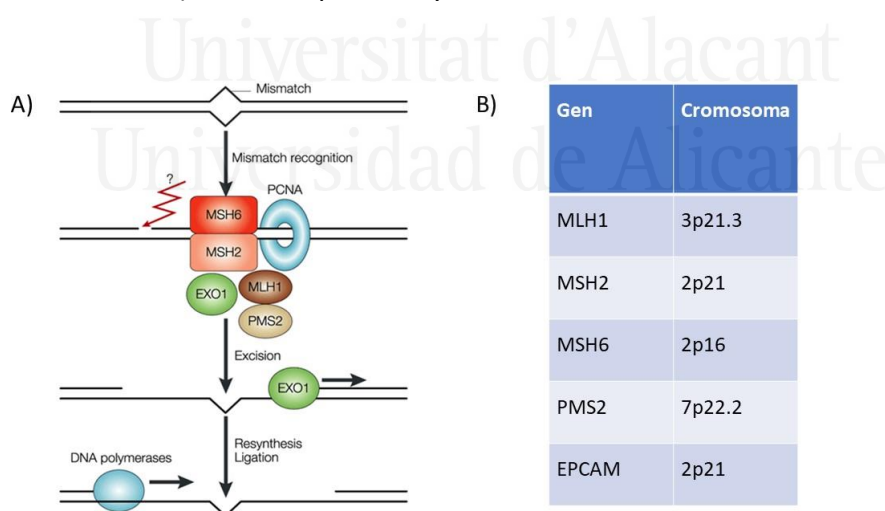
Se trata de la primera vía oncogénica descrita en el CCR y sobre la que se desarrolla la mayor parte de estos tumores, entre el 65-90% de los casos según la serie consultada.(53) Por ello se le considera como el CCR “tradicional” o “clásico”. Suele tratarse de tumores esporádicos, situándose principalmente en colon distal y a edad avanzada. La principal alteración que define a estos tumores es la presencia de aneuploidía, es decir, un número aberrante de cromosomas con grandes reordenamientos debido a deleciones o ganancias de grandes porciones de los mismos con mitosis asimétricas, resultando en una variabilidad cariotípica diversa entre las diferentes células implicadas. También es un evento característico y frecuente la pérdida de heterocigosidad a muchos niveles. El evento inicial de esta vía oncogénica es la mutación del gen supresor de tumores APC, resultando en una sobreactivación de la vía Wnt.(54) Tras este evento, la cripta aberrante focal no displásica torna en displásica. Posteriormente, otros eventos genéticos aberrantes como mutaciones en el oncogén KRAS y en las vías PIK3CA, P53 y TFG- β producen un avance en la secuencia adenoma-carcinoma hasta la aparición de un tumor.(56,57) Si bien a lo largo de esta secuencia en la vía de inestabilidad cromosómica pueden acumularse más de 80 mutaciones distintas, la mayoría serán “passenger mutations”, esto es, mutaciones incidentales que no desencadenarán cambios en el proceso evolutivo tumoral. Sin embargo, se estima que aproximadamente 15 de ellas son las que realmente conducirán hacia la progresión neoplásica, las mutaciones conductoras o “driver mutations”.(58) Estas mutaciones conductoras existen en todas las vías oncogénicas del CCR, si bien según cada una las mutaciones/alteraciones genéticas serán diferentes.

- Vía de la inestabilidad de microsatélites (MSI-pathway)

Se trata de una vía carcinogénica cuya principal característica es la presencia de alteraciones en los microsatélites de determinados genes.(59) Los microsatélites son secuencias cortas de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem ((A) n , (GA) n , etc...) que se sitúan en multitud de localizaciones a lo largo del genoma. Estas secuencias, con tendencia

a desalinearse respecto a la hebra complementaria (*slippage*), son propensas a presentar errores durante la replicación por parte de la DNA-polimerasa, bien inserciones o deleciones. Estos errores son eficazmente reparados por un sistema específico de reparación de errores del DNA (MMR, mismatch repair system), constituido por varias proteínas, de entre las cuales las más conocidas e implicadas en este sistema son MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 y EPCAM.(60) Estas proteínas forman heterodímeros (MSH2 con MSH6, que suelen acudir en primer lugar; y MLH1 con PMS2, que acuden a continuación), y una vez localizado el error, conformando una estructura compleja de interacción entre todas ellas (Figura 6), lo reparan.(61) Si estos errores se dan sobre microsatélites que se encuentran en regiones codificantes de genes supresores de tumores, oncogenes u otros que regulan el ciclo celular y apoptosis, y a su vez la expresión de algunas de estas proteínas reparadoras se encuentra inactiva en sus dos alelos, bien por mutación o metilación en su gen correspondiente, estos errores en el DNA permanecen, dando lugar al fenómeno conocido como inestabilidad de microsatélites (IMS).

Figura 6. Sistema reparador de errores del DNA. A) Acción del sistema ante un error en la replicación. Imagen extraída de “Hamida H, Lambrecht B. *Nature Reviews Immunology. Nat Rev Immunol. 2008*”; B) Genes implicados y su localización cromosómica.



Este hecho propicia el desarrollo de numerosas mutaciones, de ahí que a estos tumores también se les conozca por su fenotipo hipermutador.(62) Entre las dianas más frecuentes de estas mutaciones encontramos genes de la familia SMAD, TFGBR2, BAX y ACVR2A.(63–

66) Las proteínas del sistema MMR principalmente afectas en CCR son MLH1 y en menor medida MSH2, siendo responsables entre ambas de más del 90% de los tumores colorrectales con IMS.(67) Cuando el tumor es de origen esporádico, se considera la metilación de MLH1 como el fenómeno desencadenante.(68)

Los tumores colorrectales que siguen esta vía constituyen aproximadamente el 10-15% de todos los CCR. El 75% aproximadamente son esporádicos, mientras que el 25% restante son tumores familiares. Así como en los tumores esporádicos esta inactivación del sistema MMR se encuentra únicamente en las células tumorales, en los familiares la mutación es de origen germinal y por tanto se encuentra en el DNA constitucional. Independientemente de su origen familiar o esporádico, destacan como características clínicas que se encuentran principalmente en colon proximal, suelen ser de mayor tamaño e histológicamente de tipo mucinoso y presentan infiltración linfocitaria y con células en anillo de sello. Además, el intervalo de tiempo entre la presencia de mucosa sana y el desarrollo tumoral es menor y no responden correctamente a la quimioterapia convencional.(59,69–73) Pese a ello, presentan generalmente buen pronóstico, considerando la gran infiltración linfocitaria presente como responsable de este hecho actuando a modo de contención. Recientemente se ha descrito respuesta a la inmunoterapia con pembrolizumab, con buenos resultados clínicos en términos de supervivencia global.(74)

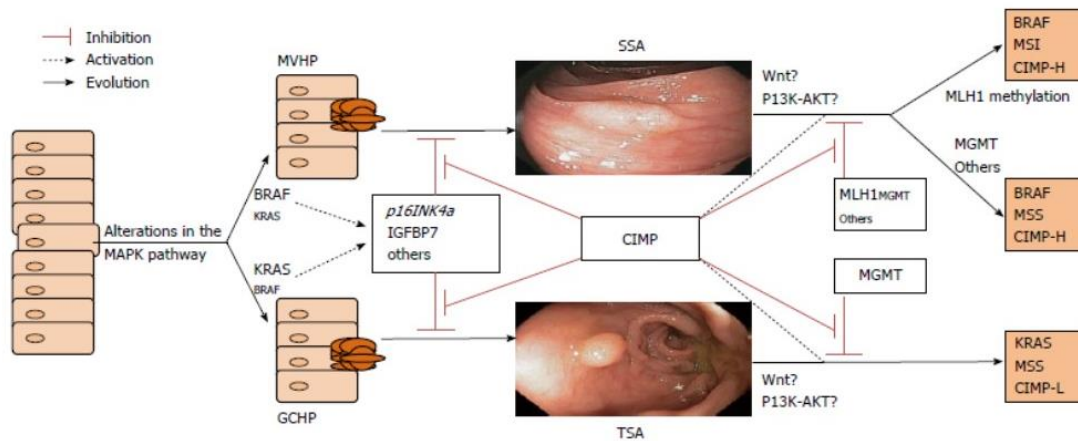
Dentro de los tumores familiares con IMS, es decir, el 25% de los tumores con IMS, el paradigma lo constituye el síndrome de Lynch. Se trata un síndrome familiar con una predisposición a desarrollar tumores a diferentes niveles del organismo. Entre ellos, destacan el cáncer colorrectal hereditario no polipósico, seguido del cáncer endometrial. Con menor frecuencia, se dan tumores de ovario, estómago, páncreas, vía biliar, intestino delgado, tracto urinario superior, sistema nervioso y algunos tumores cutáneos.(75) Patogénicamente, son las alteraciones en MLH1 y MSH2 las más frecuentemente encontradas, y a su vez las más agresivas, apareciendo estos tumores a edades más tempranas que en el CCR con inestabilidad cromosómica. Constituye aproximadamente el 3% de todos los CCR y es más prevalente en sexo masculino.(76)

- Vía serrada o del fenotipo metilador

En 1999, Lino y col. sugirieron la existencia de otra vía alternativa de oncogénesis, en la cual algunas lesiones hiperplásicas podían ser precursoras de aproximadamente el 15-20% de los CCR, de mayor prevalencia en raza caucásica.(77) Esta vía, conocida por tal nombre por dar lugar a lesiones con apariencia serrada en el examen histológico, se caracteriza molecularmente por presentar metilación aberrante de islas CpG a lo largo del genoma.(78)

Dentro de la vía serrada, podemos distinguir dos subgrupos, en función del grado de metilación del tumor asociado (Figura 7). Por una parte, tumores con alto grado de metilación (CIMP-H), conformado por la presencia de metilación de 3 de 5 genes estudiados, o 6 de 8 según la técnica empleada.(79) Por otro lado, tumores con bajo grado de metilación (CIMP-L), con 1-2 de 5 genes metilados o 2-5 de 8, igual que en el caso anterior. Los CCR de la vía serrada que siguen un patrón CIMP-H suelen presentar una alta tasa de mutaciones, entre ellas en el gen BRAF, así como una alta prevalencia de IMS por hipermetilación del gen MLH1. Se sitúan predominantemente en el colon derecho y suelen surgir a partir de lesiones serradas sésiles. En cambio, los CCR que siguen un patrón CIMP-L se asocian más frecuentemente a mutaciones en el gen KRAS, no suelen presentar IMS y por ello no son tumores hipermutados. Acontecen preferentemente en colon izquierdo y su lesión precursora suele ser el adenoma serrado tradicional.(80,81) Pese a que ambos subgrupos presentan características diferenciales, es conveniente visualizar la vía serrada como una vía de amplio espectro del CCR en el que sus subgrupos se solapan entre ellos y con las vías CIN y MSI, ya descritas.

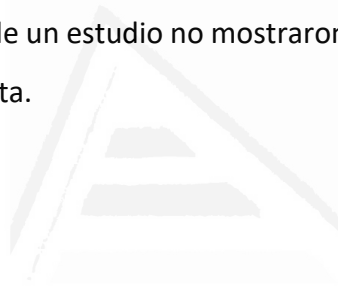
Figura 7. Vía serrada de carcinogénesis colorrectal. Importada de “Murcia O y cols. *Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. World J Gastroenterol. 2016;22(13)*”. Según las alteraciones genéticas que acontezcan, se pueden distinguir hasta 3 subgrupos. SSA: adenoma serrado sésil; TSA: adenoma serrado tradicional.



El pronóstico de los tumores de la vía serrada es variable, en función de las características genéticas subyacentes. Inicialmente se trató de vincular a la existencia o no de un único marcador. Siguiendo esta línea, los resultados obtenidos con CIMP en la literatura fueron ampliamente dispares.(82) Posteriormente se concluyó que, dada la variabilidad genética de estos tumores, no es posible vincular su pronóstico a un marcador concreto, sino que conviene tener en cuenta todo el espectro genético. De esta manera, se observó que aquellos tumores serrados CIMP que presentaban IMS se asociaban a buen pronóstico, independientemente de su asociación a mutación en BRAF. Por el contrario, aquellos CCR sin IMS que presentaban CIMP y mutación en BRAF asociaban el peor pronóstico de todos los CCR. En este sentido, parece que la IMS tiene más peso pronóstico que otras características genéticas, “frenando” el efecto proliferativo que pudiera ejercer la mutación en BRAF.

En buena parte de las ocasiones, la suma de los eventos genéticos mencionados va unido a unas características clínicas en las que el pronóstico es altamente conocido, especialmente en los tumores serrados proximales. Así, los tumores serrados con mutación en BRAF suelen ser de alto grado, se dan más frecuentemente en pacientes ancianos, con antecedente de tabaquismo importante, de estadio avanzado al diagnóstico (T4 o N2) y alta prevalencia de metástasis peritoneales.(83–85) Por otro lado, los tumores serrados con mutación en KRAS tienen unas características clínicas más variables y de pronóstico más incierto, entre ellas el sexo femenino y el alto índice de masa corporal.(86)

La respuesta al tratamiento quimioterápico va unido a las características genéticas subyacentes, por lo que nuevamente no se puede afirmar de un modo rotundo de que los tumores serrados respondan o no a la terapia adyuvante. Una vez más, los resultados respecto al valor predictivo de CIMP han resultado ampliamente dispares.(87–89) Cuando se evalúan los distintos subgrupos de pacientes con tumores serrados, se observa que aquellos con IMS, CIMP-H y mutación en BRAF presentan una supervivencia mayor, pero no relacionada con respuesta a la quimioterapia sino con el mejor pronóstico intrínseco de los tumores con IMS.(90) Por el contrario, los tumores que no presentan IMS tienen una supervivencia pésima, presentándose BRAF como un marcador sin poder predictivo de respuesta a la quimioterapia (QT). Por último, el subgrupo que presenta mutaciones en KRAS y bajo nivel de metilación presentaban una respuesta nula a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR, que explicaría el mal pronóstico de este tipo de tumores. Para la QT convencional, los resultados de un estudio no mostraron en cambio que KRAS fuese un predictor de ausencia de respuesta.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2. Biomarcadores con poder pronóstico y predictivo en el cáncer colorrectal

Un factor pronóstico es aquel que tiene la capacidad de predecir con alta probabilidad la historia natural de un proceso. En el caso del CCR, se trataría de factores o características que puedan predecir la evolución de un paciente per sé, sin recibir tratamiento alguno. Su utilidad y rentabilidad reside a la hora de tomar decisiones enfocadas a la probabilidad de recidiva tumoral, de metástasis, etc... y que, por tanto, serían subsidiarios de recibir tratamiento adyuvante. En cambio, los factores predictivos tienen la capacidad de definir subgrupos de pacientes que presenten mayor probabilidad de obtener una respuesta con los tratamientos proporcionados, ya sea en forma de supervivencia libre de enfermedad o supervivencia global según el estadio.

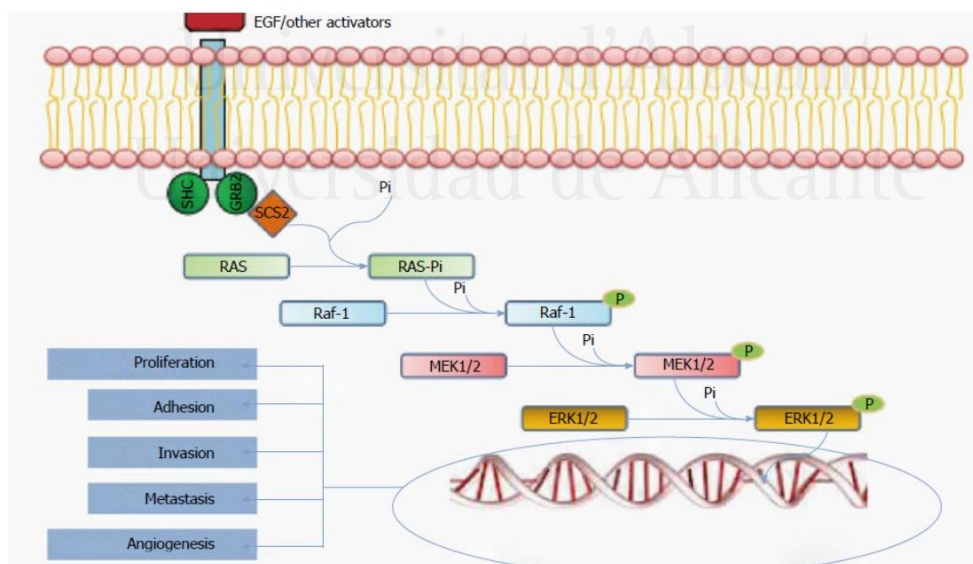
En los últimos años se ha investigado un número creciente de biomarcadores que posean ambas propiedades. Se mencionan a continuación algunos de los más explorados y relevantes.

a) BRAF

Se trata de un gen que codifica una molécula de señalización intracelular perteneciente a la familia de las RAF-quinasas, como parte de la vía MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). De los tres genes de la familia RAF (A, B y C), BRAF se encuentra localizado en la región 7p34, y presenta mutaciones en el 10% de los CCR aproximadamente.(91) Estos casos suelen corresponder a tumores de la vía serrada (rara vez como parte de la vía clásica de inestabilidad cromosómica, y excluyéndose en los tumores con inestabilidad de microsatélites),(92,93) encontrando como mutación más frecuente la V^{600E}, en la que se sustituye valina por glutamato en el codón 600 del cromosoma 7.(94) Esta mutación conlleva la expresión constitutiva del gen, aumentando por tanto la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis (Figura 7).

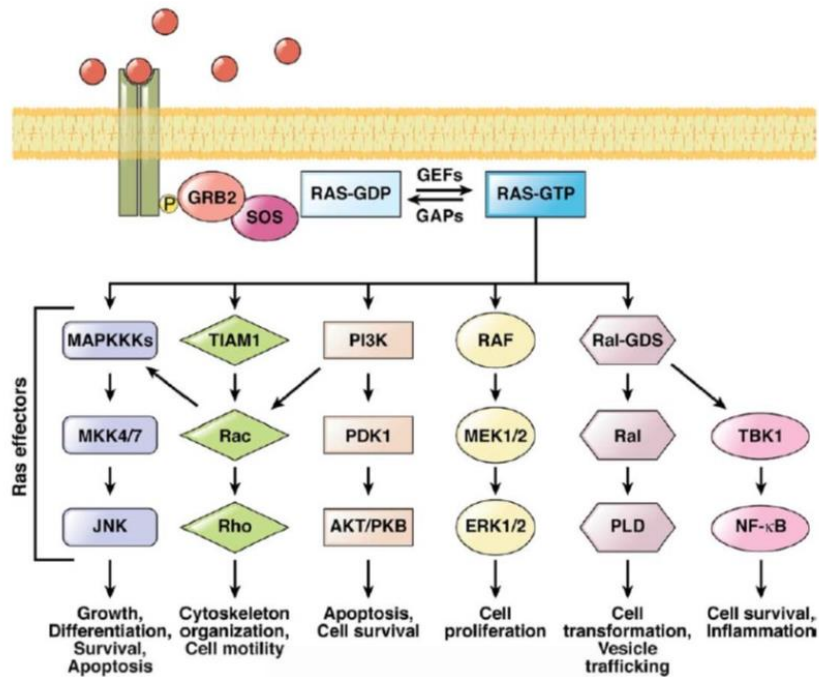
BRAF fue el primer biomarcador investigado para el CCR, describiéndose como un marcador de mal pronóstico debido a los efectos que produce sobre la remodelación de la matriz extracelular, conllevando invasión tumoral y metástasis. En un metaanálisis de 26 estudios se postuló como un marcador independiente de pobre supervivencia libre de enfermedad a los 5 años.(95) Sin embargo, este hecho está sujeto a la presencia de estabilidad de microsatélites, puesto que cuando hay inestabilidad, el pronóstico de los pacientes es mejor y no se ve alterado por la presencia de esta mutación. Relacionado con ésta se ha asociado la mutación en el gen SOX-2, gen relacionado con la migración celular, que explicaría la presencia de metástasis en estos pacientes.(96)

Figura 7. Esquema simplificado de la vía de señalización celular MAPK. Tanto la familia de las kinasas RAF como RAS se encuentran al inicio de esta vía, ejerciendo por tanto una acción directa sobre la transducción de señales intracelulares. Imagen importada de “Murcia O y cols. Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. *World J Gastroenterol.* 2016;22(13)”. MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases.



La presencia de mutación en BRAF también se relaciona con una mala respuesta al tratamiento adyuvante con anti-EGFR. A este respecto, diversos estudios y un metaanálisis han observado una pobre supervivencia global en pacientes con CCR metastásico tratados con estos fármacos, incluso del 0% de los casos.(97,98) Estos resultados son opuestos a los observados en melanoma con mutaciones en este gen, donde las respuestas son satisfactorias. Sin embargo, la respuesta a la quimioterapia convencional no varía en presencia o no de esta mutación, postulándose BRAF a este respecto como un marcador sin poder predictivo según varios trabajos.(99) Por último, se ha evaluado la respuesta a fármacos inhibidores de BRAF como vemurafenib y dabrafenib, efectivos en melanoma. Nuevamente, en CCR no parecen ejercer un efecto notable, mostrando resistencia a su efecto inhibitorio debido a una activación en la vía MAPK a través de EGFR. Entre los mecanismos propuestos para esta resistencia se hallaban la activación de la vía PIK3CA y la mutación en el gen AKT1.(100) Estudios recientes han combinado inhibidores de BRAF y EGFR, observando una respuesta modesta en pacientes con CCR metastásico y mutación en BRAF.(101) Se piensa al respecto que deben existir vías alternativas de escape que impiden unas respuestas óptimas con estos tratamientos combinados (Figura 8).(102)

Figura 8. Esquema con diferentes subvías de señalización intracelular que parten de la activación de la familia de las kinasas RAS, que posibilitarían el escape apoptótico de células neoplásicas. Ilustración tomada de “Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. Gastroenterology. 2010”.



b) KRAS

Perteneciente a la familia de las RAS-quinasas, KRAS es uno de los tres genes de esta familia (junto a N-RAS y H-RAS). Al igual que BRAF, codifica una molécula de señalización intracelular como parte de la vía MAPK, y su alteración tiene consecuencias proliferativas e inhibitorias de la apoptosis. Las mutaciones más frecuentes se dan en los codones 12 (hasta el 80%) y 13, con las mutaciones puntuales G^{12D}, G^{12V} y G^{13D}.⁽¹⁰³⁾ La proporción de CCR con mutaciones en KRAS varía entre el 30 y 40%, y aunque clásicamente han sido vinculadas a tumores que siguen la vía de la inestabilidad cromosómica, existe un porcentaje que coexiste con un bajo nivel de metilación aberrante en tumores que se desarrollan a través de la vía serrada.^(104,105)

Como marcador pronóstico, KRAS se ha asociado a una supervivencia libre de enfermedad pobre a los 5 años en la gran mayoría de estudios, independientemente de si se presentaba en tumores de la vía de inestabilidad cromosómica o de la vía serrada. Algunas mutaciones puntuales, por ejemplo, en el codón 13, comportan un comportamiento neoplásico más agresivo.⁽¹⁰⁶⁾

Respecto a su poder predictivo de respuesta al tratamiento, la principal característica de estos tumores radica en una falta de respuesta a anticuerpos monoclonales anti-EGFR

como panitumumab y cetuximab cuando existen mutaciones en KRAS (y también en NRAS) en CCR metastásico.(107) Esta pobre respuesta viene dada por mutaciones en los exones 2,3 y 4 de KRAS y de NRAS, aunque mutaciones a otros niveles como en la vía PIK3CA, PTEN y BRAF también han sido vinculados con la ineficacia de estos fármacos.(108) De hecho, la mera presencia de alteraciones en alguno de estos tres niveles es suficiente para que carezcan de efecto.(109) A día de hoy, en pacientes con CCR metastásico candidatos a terapia con anticuerpos monoclonales, se investiga la presencia de mutaciones en KRAS como parte del estudio previo. Por último, los datos sobre quimioterapia convencional son menos claros, con estudios contradictorios. No obstante, la presencia de mutaciones en KRAS no se ha vinculado con una mala respuesta al tratamiento con 5-FU, probablemente por no tener un poder predictivo a este respecto.(110)

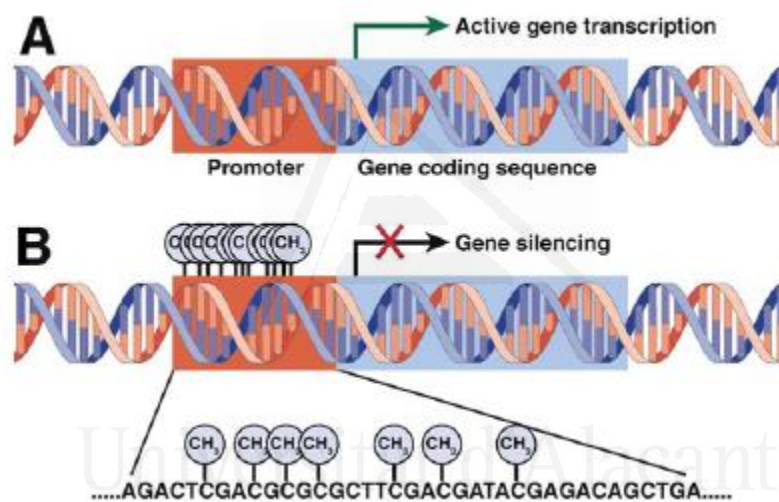
c) CIMP

CIMP (CpG island methylator phenotype) hace referencia a un fenotipo caracterizado por la presencia de metilación aberrante (o también denominada hipermetilación) en determinados loci genéticos, habitualmente que contienen islas CpG. Las islas CpG son agrupaciones de dinucleótidos de guanina (G) y citosina (C) que se distribuyen preferentemente en las regiones reguladoras y promotoras 5' del 40-50% de los genes aproximadamente, con un peso de 0.5-2kb. La metilación de estas islas da lugar a la inexpressión del gen al que está asociado. Se desconoce la causa última de esta metilación aberrante, pero se ha sugerido que la sobreexpresión de metiltransferasas,(111) las mutaciones en genes que remodelan la cromatina,(112) el tabaco(113) y mutaciones en IDH1 y TET (asociadas estas últimas a metilación en leucemia y gliomas) podrían ejercer un papel relevante.(55)

Habitualmente, estas islas CpG no se encuentran metiladas, permitiendo por tanto la expresión de los genes a los que están asociadas. En enfermedades como el cáncer, la metilación de estas regiones produce el silenciamiento de esos genes. Si esta situación acontece en genes supresores de tumores nos hallaremos en un ambiente favorecedor para la carcinogénesis (Figura 9). Por otro lado, existen otras secuencias repetitivas dispersas a lo largo del DNA denominadas secuencias parasíticas, habitualmente metiladas

y, por tanto, silenciadas. En este caso, la metilación juega un papel clave en la estabilidad cromosómica. En este contexto, la hipometilación global del DNA conduce a la inestabilidad cromosómica al permitir la expresión de estas secuencias parasíticas, hallazgo muy frecuente en el cáncer.(114)

Figura 9. Efecto de la metilación sobre la expresión génica. Ilustración tomada de “Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. Gastroenterology. 2010”. A) Expresión génica en condiciones normales. B) Expresión génica ante hipermetilación en la región promotora.



Varios estudios han tratado de esclarecer el poder pronóstico de la hipermetilación del DNA. Sin embargo, tal como se ha mencionado previamente, existe disparidad entre los resultados obtenidos. En un metaanálisis realizado con este objetivo, se observó que, tras ajustar por edad, sexo, estadio del CCR y el tratamiento recibido, la presencia de CIMP se asociaba con una menor supervivencia global.(82) No obstante, las conclusiones deben ser analizadas con cautela, puesto que no se realizó el ajuste según la presencia de inestabilidad de microsatélites y de mutaciones en BRAF o KRAS al no disponer de esos datos en algunos de los estudios incluidos. En aquellos que sí disponían de esa información, parece claro que la presencia de inestabilidad unida a CIMP se asocia a un buen pronóstico,(115) mientras que la controversia vendría dada por aquellos tumores con CIMP

y estabilidad de microsatélites. Mientras que en unos estudios la presencia de CIMP se asociaba a buen pronóstico, en otros se postulaba su ausencia de valor a tal efecto e incluso en la mayor parte de los casos se asociaba a un peor pronóstico.(116) Entre los motivos para tal disparidad se sugirió la existencia de criterios no unificados para definir CIMP, la heterogeneidad de los estudios, la ausencia de factores controladores de confusión y los diferentes métodos empleados para valorar la hipermetilación. A modo de resumen, podría decirse que el pronóstico que pueda conferir CIMP en el CCR no se limita a su presencia o ausencia, sino a la combinación con otros marcadores o alteraciones genético-moleculares. A este respecto, lo que parece evidente, es que cuando un tumor con CIMP-H coexiste con la presencia de IMS, el pronóstico del paciente es mucho mejor que cuando no lo hace.

Por lo que respecta al poder predictivo de respuesta a la quimioterapia, los datos vuelven a ser discordantes. Siguiendo una explicación fisiopatológica, la inhibición de la gamma-glutamyl hidrolasa observada en estos tumores produciría un incremento en los niveles intracelulares de folato, favoreciendo una mejor acción por parte del 5-FU. El primer metaanálisis realizado para clarificar esta cuestión, ya mencionado previamente, incluía 7 estudios con pacientes que habían recibido previamente cirugía.(82) 4 de ellos concluían que predecía una respuesta positiva pero no ajustada por la presencia de IMS; dos de ellos no objetivaron poder predictivo y el último predijo una respuesta negativa.(89,117) Otro estudio posterior, fuera del metaanálisis, corroboró una falta de respuesta a quimioterapia convencional en pacientes con CCR que presentaban fenotipo metilador.(118) Entre los motivos de dicha disparidad destaca la ausencia de criterios definidos y homogéneos para evaluar el fenotipo metilador, diferentes fármacos como parte del tratamiento y las diferentes técnicas y paneles de genes empleados. Por ello, para aclarar el papel predictivo de respuesta a quimioterapia de CIMP, se requeriría de la realización de ensayos clínicos aleatorizados. Por el momento, al igual que ocurre con la evaluación pronóstica, CIMP no se muestra como un marcador predictivo independiente de la presencia de otras alteraciones moleculares, siendo necesario visualizar todas ellas en su conjunto para aclarar tanto el pronóstico como la utilidad de proporcionar un tratamiento adyuvante basado en fármacos a un paciente.

Algunos autores han tratado incluso de vincular la presencia de metilación aberrante de un marcador genético concreto a una respuesta determinada a la quimioterapia convencional. Un estudio llevado a cabo por Ebert y cols objetivó una peor respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU en pacientes que presentaban metilación en el gen TFAP2E.(119) Este gen, situado en la región p34 del cromosoma 1, codifica un factor de transcripción que forma parte de una cascada intracelular de señalización, y se ha asociado su hipermetilación a procesos como el cáncer de próstata y también al CCR. Una de sus dianas es la proteína DKK4, vinculada en líneas celulares con la resistencia al 5-FU y sobreexpresada en mucosa colónica de pacientes con colitis.(120–122) La proteína codificada por TFAP2E produciría un fenómeno de down-regulation sobre el gen que codifica DKK4. Siguiendo este razonamiento, la inactivación de TFAP2E por metilación se traduciría en una mayor expresión de DKK4 y, por tanto, en una mayor resistencia al 5-FU. Los resultados obtenidos por los autores fueron positivos, demostrando efectivamente una peor respuesta quimioterápica con la inexpressión de TFAP2E. Sin embargo, cabe remarcar algunas limitaciones del estudio como puedan ser un tamaño muestral relativamente pequeño (220 pacientes) para el objetivo del estudio, con sujetos procedentes de 4 ensayos clínicos diferentes, y que además realizó únicamente el análisis de la expresión y metilación de TFAP2E en una porción de la muestra de sujetos. Dada la relevancia clínica que podría suponer tener un biomarcador predictor de respuesta a quimioterapia con 5-FU, sería pertinente poder solventar estas limitaciones y validar en cohortes externas los resultados presentados.

d) Inestabilidad de microsatélites

La presencia de inestabilidad de microsatélites en el CCR, sea de origen familiar o esporádico, ha sido vinculada a un pronóstico más favorable que el de aquellos pacientes con tumores estables. Con ello, los tumores con inestabilidad de microsatélites presentan el mejor pronóstico de todos los CCR independientemente de la asociación de otras alteraciones genómicas (sean mutaciones en BRAF, KRAS o errores epigenéticos). En cambio, es en tumores con estabilidad de microsatélites donde la adición de otros errores ejerce un papel pronóstico determinante. Por ello, mientras que la inestabilidad de

microsatélites puede explicar de manera independiente el relativo buen pronóstico de un paciente, aquellos tumores estables presentarán un pronóstico mejor o peor en función de la asociación de otras alteraciones. Una vez más, se pone de manifiesto la necesidad de visualizar en conjunto del perfil genético de estas neoplasias.

Se ha descrito un pronóstico similar en aquellos CCR con estabilidad respecto a otros con inestabilidad de microsatélites, sean familiares o esporádicos, cuando no existen mutaciones en BRAF, KRAS o presencia de metilación aberrante concomitantes. Sin embargo, la existencia de metilación aberrante en CCR en estadios II o III conlleva un peor pronóstico en pacientes que presenten estabilidad de microsatélites respecto a los que no.(123) Del mismo modo, aquellos tumores estables, hipermetilados y con mutaciones en BRAF tienen una alta probabilidad de haber desarrollado metástasis hepáticas al diagnóstico.(124) Esta combinación de alteraciones moleculares es la que peor pronóstico alberga de todos los CCR.

El poder predictivo de respuesta a la quimioterapia convencional en tumores con inestabilidad de microsatélites se ha evaluado reiteradamente.(90,125–128) Varios estudios han observado una falta de respuesta a la quimioterapia con 5-FU en tumores en estadios II y III, incluyendo cohortes con más de 500 pacientes y ajustado por edad, sexo y estadio. A pesar de ello, un estudio que incluía pacientes con CCR estadio III tratados con FOLFOX +/-cetuximab y comparados según presentasen inestabilidad o no concluyó que el mayor aumento de la supervivencia libre de enfermedad lo obtuvieron aquellos con tumores inestables.(129) Además, también se ha asociado la falta de expresión del gen BAX con una mejor respuesta al irinotecán en estos pacientes. A la luz queda que los resultados son contradictorios.

En cambio, la literatura coincide en que los tumores estables presentan una buena respuesta al 5-FU en estadio III en términos de supervivencia global y libre de enfermedad. Se acepta que para tumores estables en estadio II se proporcione quimioterapia si existe algún factor de mal pronóstico como obstrucción, perforación o tumor en estadio local T4. En resumen, mientras que la inestabilidad de microsatélites se asocia a un mejor pronóstico de manera intrínseca, son los tumores con estabilidad de microsatélites los que han mostrado una mejor respuesta a la quimioterapia adyuvante.

El incremento en la expresión de ciertas proteínas que actúan como receptores del sistema inmune (PD-1, PD-L1, LAG-3, IDO, CTLA-4...) en tumores con inestabilidad de microsatélites ha conducido al desarrollo de fármacos que actúan a este nivel. En un estudio que incluía pacientes con CCR estadio IV se observó una respuesta mucho mayor al pembrolizumab (anti-PD-1) cuando el tumor presentaba inestabilidad de microsatélites que cuando no, con respuestas que superaban el 60%. Siendo infrecuente hallar un CCR con IMS en estadio IV, se considera que el óptimo uso de este fármaco incluiría aquellos tumores inestables en estadios iniciales.(51)



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3. Sistemas de clasificación del cáncer colorrectal basados en biomarcadores

La constante búsqueda de biomarcadores pronósticos y de respuesta a la quimioterapia, unido a una caracterización cada vez más profunda de las vías oncogénicas del CCR, ha llevado a la creación de sistemas de clasificación del CCR basados en el perfil genético y molecular.(130) Estos sistemas pretenden por un lado definir las características genético-moleculares y clínicas de estos tumores y por otro lado poder predecir la evolución del mismo en términos pronósticos para el paciente. En 2015 se publicaron dos artículos con clasificaciones muy similares del CCR, basados en la existencia de mutaciones en BRAF o KRAS, la presencia de CIMP y la inestabilidad de microsatélites.

El primero de ellos incluyó más de 2000 pacientes con CCR, dividiéndolos en primer lugar según presentasen inestabilidad de microsatélites o no. Posteriormente, se tenía en cuenta la presencia de fenotipo metilador y en último lugar, la existencia de mutaciones en BRAF o KRAS.(131) Las posibles combinaciones, siguiendo los conocimientos teóricos sobre las vías carcinogénicas, mostraban 5 subtipos de CCR, en los que el subtipo 5 incluía pacientes con CCR familiar con inestabilidad de microsatélites, el subtipo 4 hacía lo propio con tumores que seguían la vía de la inestabilidad cromosómica y los subtipos 1 y 2 albergaban pacientes con CCR que seguían la vía serrada (Tabla 2). El subtipo 3 contenía una mezcla de pacientes con CCR desarrollado a través de la vía serrada o de la vía de la inestabilidad cromosómica, mientras que hasta un 12% no presentaba una combinación genética que encajase en algún subtipo concreto.

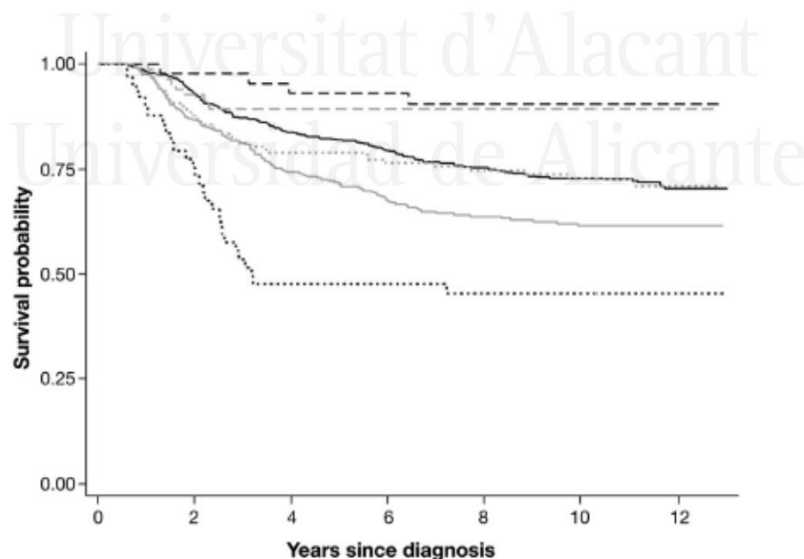
Tabla 2. Esquema sobre la composición genética de los diferentes subtipos de cáncer colorrectal propuesto, por Phipps y cols. MMR: sistema reparador de errores del DNA. CIMP: fenotipo metilador. MSI: inestabilidad de microsatélites. MSS: estabilidad de microsatélites. MSI-L: bajo grado de inestabilidad. MSI-H: alto grado de inestabilidad.

Phipps	MMR	CIMP	BRAF	KRAS
Subtipo 1	MSI-H	+	+	-
Subtipo 2	MSS o MSI-L	+	+	-

Subtipo 3	MSS o MSI-L	-	-	+
Subtipo 4	MSS o MSI-L	-	-	-
Subtipo 5	MSI-H	-	-	-

La comparación de la supervivencia libre de enfermedad entre los diferentes subtipos mostró unas curvas de Kaplan-Meier bien diferenciadas, como se puede comprobar en la Figura 10. Estableciendo el subtipo 4 como referencia por ser el más frecuente, el subtipo 2 (CCR a través de la vía serrada, estable y con mutación en BRAF) presentaba el peor pronóstico mientras que los subtipos 1 y 5 (tumores con inestabilidad de microsatélites) poseían la mayor tasa de supervivencia. El ajuste según edad, sexo, estadio al diagnóstico, índice de masa corporal e historia de tabaquismo mostró unos resultados similares en el análisis multivariable. Del mismo modo, el análisis de supervivencia global arrojó las mismas conclusiones.

Figura 10. Curvas de supervivencia para los diferentes subtipos de cáncer colorrectal, según el estudio de Phipps y cols. (131)



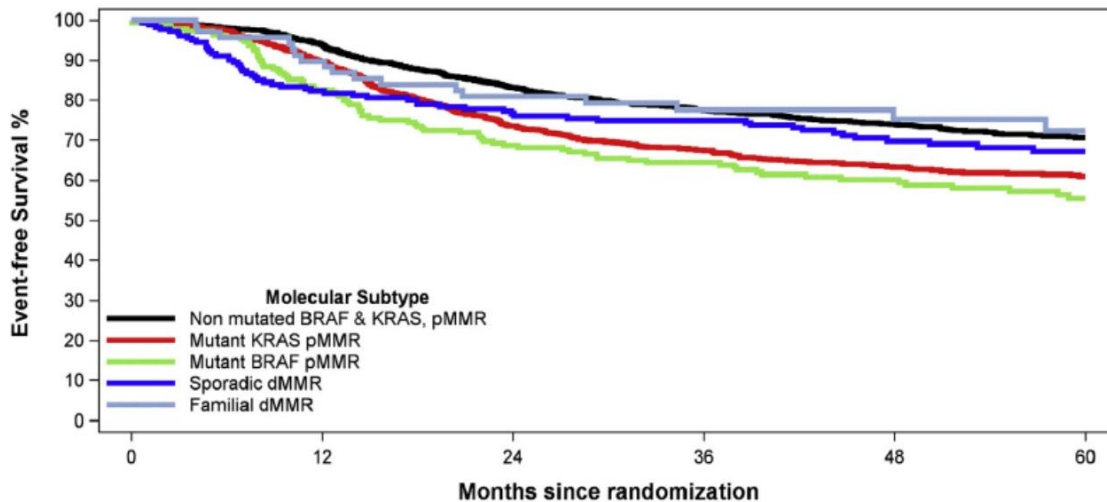
Por otro lado, el segundo artículo incluía 2700 pacientes con CCR en estadio III que formaban parte de un ensayo clínico sobre el tratamiento mediante FOLFOX +/-

cetuximab.(132) Se dividió el CCR según existiese en primer lugar inestabilidad de microsatélites y posteriormente según presentase mutación en BRAF o en KRAS. Adicionalmente se estudió la metilación de MLH1 en tumores inestables sin mutación en BRAF para discernir su origen familiar o esporádico. Combinando estos análisis se concretaron 5 subtipos (Tabla 3), similares a los mencionados previamente. Las curvas de Kaplan-Meier diseñadas en el análisis univariable muestran cómo en este estudio las diferencias no son tan llamativas como en el previo (Figura 11).

Tabla 3. Esquema sobre la composición genética de los diferentes subtipos de cáncer colorrectal propuesto, por Sinicrope y cols. MMR: sistema reparador de errores del DNA. CIMP: fenotipo metilador. MSI: inestabilidad de microsatélites. MSS: estabilidad de microsatélites. MSI-L: bajo grado de inestabilidad. MSI-H: alto grado de inestabilidad

Sinicrope	MMR	CIMP	BRAF	KRAS
Subtipo 1	MSI	+	+	+/-
Subtipo 2	MSS	+/-	+	-
Subtipo 3	MSS	+/-	-	+
Subtipo 4	MSS	+/-	-	-
Subtipo 5	MSI	-	-	+/-

Figura 11. Curvas de supervivencia para los diferentes subtipos de cáncer colorrectal, según el estudio de Sinicrope y cols.(132)



Si bien los resultados se enfocan de manera diferente, estableciendo comparaciones múltiples entre los diferentes subtipos, cuando en el análisis multivariable se toma como referencia el subtipo mayoritario (el 4, el que sigue la vía clásica CIN) tanto los subtipos 2 como 3 presentan un menor tiempo de supervivencia libre de enfermedad a 5 años. En cambio, no se observaron diferencias significativas entre el subtipo 4 y aquellos con inestabilidad de microsatélites (1 y 5). Estos hallazgos fueron validados posteriormente por el mismo grupo en una cohorte externa de 700 pacientes procedentes de otro ensayo clínico.

Ambos artículos tienen en consideración una serie de eventos genéticos considerados como “driver mutations/alterations” que, a tenor de los investigadores, serían los que determinarían en último término el devenir del paciente. Recientemente vio la luz otra clasificación del CCR, la más completa hasta el momento y que incluía casi 3000 pacientes, denominada CMS (Consensus Molecular Subtypes).⁽¹³³⁾ Esta clasificación tiene en cuenta, además de alteraciones genéticas, aspectos metabólicos, la respuesta inmune, fenotipo hipermutador, activación de vías de señalización moleculares e infiltración estromal, entre otros. Este sistema CMS establece 4 subtipos de CCR: el subtipo 1, con tumores con inestabilidad de microsatélites y alta infiltración inmune, metilados y con mutaciones en BRAF (que equivaldría al subtipo 1 de nuestro estudio); el subtipo 2, con tumores que pertenecerían a la vía clásica de la inestabilidad cromosómica (el subtipo 4 en este caso); el subtipo 3, denominado “subtipo metabólico”, con tumores con mutación en KRAS y bajo nivel de metilación (similar al subtipo 3); y por último, el de peor pronóstico, el subtipo 4,

denominado “mesenquimal”, caracterizado por gran actividad angiogénica e infiltración estromal con activación del factor TGF-β (sin existir claramente un subtipo que encaje con la clasificación de nuestro estudio). Las equivalencias entre los subtipos son aproximadas, puesto que no existe una clara correlación entre ambas clasificaciones. La Figura 12 muestra las principales características de cada subtipo.

Figura 12. Subtipos de la clasificación CMS del cáncer colorrectal. Ilustración tomada del artículo original “Guinney J y cols. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med. 2015”

CMS1 MSI immune 14%	CMS2 Canonical 37%	CMS3 Metabolic 13%	CMS4 Mesenchymal 23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF-β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Cada subtipo presenta una firma de características clínicas y un pronóstico diferente. Así, por ejemplo, el CCR del CMS 1 es más frecuente en mujeres y el tumor se localiza principalmente en el lado derecho y presenta alto grado de diferenciación. En cambio, el CMS 2 se da sobre todo en el lado izquierdo. En términos de supervivencia, tanto global como libre de enfermedad, el CMS 4 presenta el peor pronóstico. Culpa de ello es que suele diagnosticarse en estadíos avanzados III o IV.

A pesar de la cantidad de información que proporciona la clasificación CMS del CCR, su aplicabilidad traslacional a la práctica clínica es limitada dada la ingente cantidad de recursos necesarios para clasificar de esta manera el tumor de un paciente. A este respecto, las aproximaciones llevadas a cabo por Phipps y Sinicrope parecen situarse, en términos

económicos, más al alcance de cualquier centro a la hora de clasificar el CCR. Si bien los resultados de ambos estudios son llamativos y novedosos en términos pronósticos, conviene validarlos en otras cohortes a fin de poder implementar estos sistemas de clasificación a la hora de enfocar un paciente con CCR, ya sea en términos pronósticos o predictivos de respuesta a fármacos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Artículo 1

La determinación de unas alteraciones genético-moleculares concretas en muestras de tumores colorrectales obtenidas en la colonoscopia diagnóstica puede ser de utilidad para predecir el pronóstico y la respuesta a la quimioterapia en esos pacientes.

Artículo 2

La expresión o no del gen TFAP2E y su metilación no constituyen un biomarcador predictivo de respuesta a la quimioterapia convencional en pacientes con CCR.

Objetivos

Artículo 1.

Determinar el pronóstico y la respuesta a la quimioterapia en pacientes con diagnóstico de CCR en función del perfil genético-molecular tumoral basado en el estudio de mutaciones somáticas en BRAF y KRAS, así como la presencia de inestabilidad de microsatélites y fenotipo metilador.

Artículo 2

Evaluar y comparar la supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con CCR tratados con 5-FU en función de la presencia o no de metilación y la expresión del gen TFAP2E.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

5. Material y Métodos

Artículo 1: Murcia et al. "Colorectal cancer molecular classification using BRAF, KRAS, microsatellite instability and CIMP status: Prognostic implications and response to chemotherapy". PLOS One 2018. 13-9.

1. Diseño y población de estudio

Se diseñó un estudio observacional retrospectivo multicéntrico nacional que incluyó un total de 878 pacientes procedentes de las cohortes EPICOLON 1 Y EPICOLON 2. EPICOLON 1 es un proyecto multicéntrico iniciado en el año 2000 que incluyó de manera consecutiva pacientes con CCR de 26 centros españoles y cuyos objetivos eran determinar la frecuencia de síndrome de Lynch en España y definir la estrategia óptima para la selección de pacientes a los que realizar el estudio genético. Por su parte, el proyecto EPICOLON 2 tuvo comienzo en el año 2006. Perseguía no sólo la identificación de genes implicados en el CCR hereditario y familiar sin alteraciones en la vía reparadora de errores del DNA, sino también determinar los genes implicados en las distintas formas de CCR, incluyendo las de la vía serrada.

Se dispuso del consentimiento informado de los pacientes, previa aprobación del estudio por parte del comité ético del Hospital General Universitario de Alicante.

2. Recogida de la información y variables

Toda la información recopilada provino de las bases de datos EPICOLON 1 y 2. Se diseñó una nueva base de datos que incluyó información demográfica de los pacientes incluidos en el estudio, así como características basales tales como edad en el momento de la inclusión, sexo, localización tumoral, fecha del diagnóstico de CCR y estadio tumoral, presencia de mutaciones en BRAF y KRAS, CIMP y presencia de inestabilidad de microsatélites, tipo de tratamiento (quirúrgico, quimioterápico o radioterápico) y tiempo de supervivencia libre de enfermedad (TSLE). La respuesta tumoral al tratamiento con QT

se evaluó en estadios II de mal pronóstico (definido como presencia de T4 dentro de la clasificación TNM, que indica una profundidad tumoral que alcanza órganos o tejidos adyacentes o el peritoneo visceral) y III, constituyéndose el TSLE como la variable principal del estudio. El seguimiento de los pacientes tras una eventual cirugía se realizó de acuerdo a los estándares de práctica clínica habitual, con medición de CEA periódicamente, TAC y colonoscopias regladas.(134)

3. Manejo de las muestras

a. Extracción del DNA

Para este estudio se emplearon muestras embebidas en parafina de tejido tumoral de los diferentes centros participantes, las cuales se enviaron al Hospital General Universitario de Alicante para su análisis genético-molecular. Se extrajo DNA con los kits “QIAamp DNA Investigator (QIAGEN, Hilden Alemania) y “E.Z.N.A Forensic DNA (OMEGA Bio-tek, Estados Unidos)”, según los protocolos proporcionados por los centros fabricantes.

b. Análisis de las mutaciones en genes BRAF y KRAS

Tras la extracción del DNA, se analizó la presencia de mutación en el codón V^{600E} del gen BRAF mediante PCR a tiempo real (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA), empleando sondas específicas Taqman con 6-carboxyfluoresceína como fluoróforo para la detección del alelo mutado y VIC para el no mutado. Posteriormente, mediante discriminación alélica se comparó la fluorescencia de ambos alelos empleando el software informático del sistema ABI Prism 7500.(135)

El análisis de mutaciones en KRAS se centró en el exón 1, codones 12 y 13, y empleó la secuenciación directa tipo *Sanger* del DNA. En primer lugar, se realizó una PCR empleando polimerasa *Ampli-Taq* unida a los primers forward y reverse. Después, se aplicó ExoSAP IT para la limpieza de impurezas obtenidas durante la PCR y en último lugar se llevó a cabo la secuenciación directa mediante BigDye.

En ambos casos, la presencia de mutaciones se determinó a través del sistema 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).(136)

c. Estudio del fenotipo metilador (CIMP)

Para el estudio de metilación aberrante en islas CpG en diferentes regiones del genoma se empleó la técnica Methylight, llevando a cabo en primer lugar una modificación del DNA mediante bisulfito sódico empleando el kit “EZ Methylation Gold” (Zymo Research, Orange, CA).(137) Se añadieron los primers directos e inversos, ligasa, la polimerasa HotStar Taq y agua para la PCR. Se analizó la presencia de metilación aberrante en 5 genes (*CACNAG1*, *SOCS1*, *RUNX3*, *NEUROG1* and *MLH1*), considerando una muestra metilada cuando 3 de esos 5 genes presentaba metilación aberrante, o bajo nivel ante la presencia de 1 o 2 marcadores metilados.

d. Análisis de la inestabilidad de microsatélites

Para el estudio de la inestabilidad de microsatélites se empleó el panel de 5 marcadores propuesto por el “National Cancer Institute” (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250),(138) o el pentaplex de repeticiones de mononucleótidos en BAT25, BAT26, NR21, NR24 y NR27.(139) Se llevó a cabo una reacción en cadena de polimerasa para valorar la presencia de deleciones o inserciones en las secuencias de microsatélites.(140) Se consideró la presencia de inestabilidad en dos o más marcadores como criterio para definir la inestabilidad de microsatélites, considerando el resto de tumores como estables.

e. Clasificación del CCR

De acuerdo al modelo propuesto por Phipps y cols.(131) se dividió el total de 878 pacientes en 5 subtipos de acuerdo a las combinaciones moleculares propuestas y de acuerdo con las vías carcinogénicas descritas (Tabla 4). Los subtipos 1 y 2 engloban tumores desarrollados a través de la vía serrada, con la diferencia de que el subtipo 1 presenta inestabilidad de microsatélites. El subtipo 4 se define por la presencia de tumores de la vía tradicional de la inestabilidad cromosómica y el subtipo 5 por tumores familiares con inestabilidad de microsatélites, siendo el síndrome de Lynch el más representativo. El subtipo 3 engloba tumores de dos estirpes, tumores con inestabilidad cromosómica y tumores serrados, con la característica común de presentar mutado el gen KRAS.

Tabla 4. Clasificación del cáncer colorrectal basada en subtipos genético-moleculares seleccionada para el presente estudio. MMR: sistema reparador de errores del DNA. CIMP: fenotipo metilador. IMS: inestabilidad de microsatélites. EMS: estabilidad de microsatélites.

	MMR	CIMP	BRAF	KRAS
Subtipo 1	IMS	+	+	-
Subtipo 2	EMS	+	+	-
Subtipo 3	EMS	-	-	+
Subtipo 4	EMS	-	-	-
Subtipo 5	IMS	-	-	-

f. Tratamiento quimioterápico

La decisión de proporcionar QT adyuvante a un paciente con CCR fue tomada por el oncólogo responsable de cada paciente, en cada centro. Dicho tratamiento siguió los estándares de práctica clínica habitual. Los pacientes con neoplasias en estadios II de mal pronóstico y III recibieron un tratamiento de primera línea basado en capecitabina o un régimen de 5-fluoruracilo (5-FU), ya fuera sólo o en combinación con oxaliplatino (FOLFOX) o irinotecán (FOLFIRI). La decisión del tipo de tratamiento, así como el número de ciclos y dosis de los fármacos, corrieron a cargo nuevamente del criterio del oncólogo responsable. Dicho oncólogo desconoció en todo momento el estado de los 4 marcadores genético-moleculares analizados en cada tumor.

g. Análisis estadístico

Todos los análisis del presente estudio se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 22. Con el fin de aumentar el número de casos disponibles para el análisis y de reproducir la metodología en la que se basa este estudio, se obtuvieron varios modelos de imputación múltiple con el fin de completar los valores perdidos en un marcador (n=141) o como mucho dos marcadores (n=16) genético-moleculares. (141) Se llevaron a cabo 25 rondas de

imputación mediante un método multivariante normal hasta que se obtuvo un modelo que reprodujo el original con una desviación $< 0.1\%$ para los marcadores con valores perdidos. Con el fin de confeccionar este modelo con la máxima exactitud posible se tuvieron en cuenta otras variables tales como edad, sexo, localización tumoral, estadio TNM, estado de BRAF, KRAS, CIMP e inestabilidad de microsatélites, tratamiento quimioterápico y tiempo de supervivencia libre de enfermedad. Una vez obtenido el modelo completo, se clasificó cada paciente dentro de los subtipos 1 a 5. Aquellos pacientes con combinaciones de alteraciones no descritas arriba se incluyeron en otro grupo denominado “no clasificables”. Se realizaron varias simulaciones analíticas, en forma de riesgos relativos y hazard ratios, a fin de concluir la validez del modelo imputado. Los análisis realizados sobre el modelo original se pueden consultar en el Anexo 1.

En cuanto al análisis de los datos, las variables paramétricas continuas se reflejan con la media \pm la desviación estándar (DE), mientras que las no paramétricas lo hacen mediante el rango intercuartílico (RIq), empleando como métodos comparativos test t-Student o U de Mann Whitney. Por otro lado, la descripción de variables categóricas se realizó mediante porcentajes, y su comparación mediante test ji-cuadrado.

El análisis univariante del pronóstico global, medido en TSLE (intervalo entre el tiempo de remisión de la enfermedad y su reaparición), se llevó a cabo mediante el test log-Rank y se plasmó gráficamente con curvas de Kaplan Meier. Para el análisis multivariante se confeccionó un modelo de regresión de Cox que tuvo en cuenta variables potencialmente confusoras tales como edad, sexo, estadio TNM y QT, tomando el subtipo 4 como referencia.

Para el análisis de la respuesta al tratamiento adyuvante se realizó un análisis univariante para cada subtipo, ajustando posteriormente por edad, sexo y estadio TNM. Dado que la comparación se realizaba según recibiera o no QT dentro de cada subtipo, no fue necesario establecer en este caso un subtipo de referencia.

Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0.05 de modo bilateral.

Artículo 2: Murcia et al. "TFAP2E Methylation and Expression Status Does Not Predict Response to 5-FU-based Chemotherapy in Colorectal Cancer". Clinical cancer research (2018).

1. Diseño y población de estudio

Se diseñó un estudio analítico observacional retrospectivo que incluyó un total de 783 pacientes con CCR procedentes de dos cohortes independientes. Una de ellas incluyó 532 pacientes del proyecto EPICOLON 1 con neoplasias en estadios II-IV diagnosticados entre los años 2000-2001. Estos pacientes recibieron QT según el criterio del oncólogo y de acuerdo a las dosis y pautas estándar, siendo el tratamiento más administrado la combinación de 5-FU + leucovorina y quedando en menos del 10% las combinaciones de 5-FU con oxaliplatino o irinotecán.(72,89,142,143) En los pacientes con CCR estadio IV, estas últimas combinaciones superaban el 20% de los casos. La segunda cohorte albergaba 251 pacientes procedentes de un ensayo clínico entre 1996-2008 con neoplasias en estadios II-IV también, que recibieron 5-FU + leucovorina en estadios no metastásicos durante 6 meses o añadiendo en caso de diseminación a distancia oxaliplatino.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de cada centro y se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente.

2. Manejo de las muestras

a. Extracción del DNA

Se obtuvo material de neoplasias conservadas en parafina y fijadas previamente con formalina mediante el kit "QIAamp DNA Mini Kit" y "QIAcube (QIAGEN, Hilden Alemania)". Posteriormente, se empleó bisulfito sódico como parte del kit "EZ Methylation Gold (Zymo Research)" a fin de modificar el DNA previo a la amplificación por PCR para el estudio de la metilación del gen TFPA2E.

b. Estudio de la metilación del gen TFAP2E

Se realizó pirosecuenciación cuantitativa empleando el kit "PSQ HS 96A (Qiagen)" para el estudio de la metilación del gen TFAP2E. Se reprodujo la metodología empleada por Ebbert y cols en su estudio,(119) diseñando dos ensayos diferentes para mapear diferentes islas

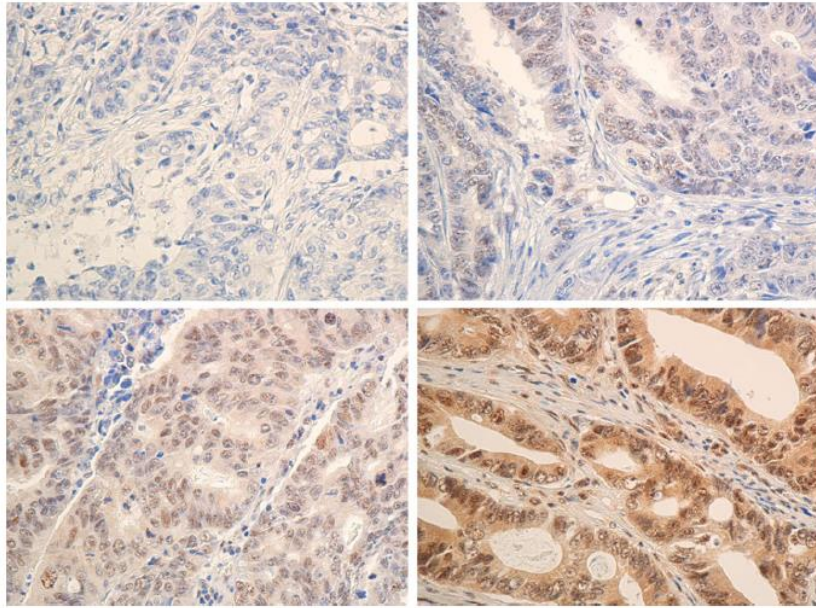
CpG del citado gen y estudiar su metilación, una en la región promotora (exón 1) y la otra en el intrón 3. Las secuencias primer empleadas pueden ser consultadas en el Anexo 2, Tabla S3.

c. Inmunohistoquímica de la expresión de TFAP2E

La expresión proteica de TFAP2E fue evaluada mediante inmunohistoquímica (IHQ) al disponer del protocolo y del anticuerpo policlonal anti-TFPA2E, generosamente cedido por el Dr. C. Rocken, Departamento de Gastroenterología, Hepatología y Enfermedades Infecciosas, Universidad Otto-von-Guericke, Magdeburg, Alemania. Las tinciones IHQ las realizaron dos expertos patólogos (Dra Alenda y Dra Egoavil), desconocedoras de la presencia o no de metilación en dicho gen.

Se puntuó de 0 a 3 la intensidad de la tinción. Se consideró como normal la expresión proteica del gen cuando las células epiteliales tumorales mostraban tinción en los núcleos, independientemente de la tinción o no de su citoplasma. La puntuación de 3 quedó definida por una intensidad de tinción homogénea y evidente a 10x aumentos. Una tinción fuerte pero heterogénea a 20x aumentos puntuó como 2, mientras que se reservó la puntuación de 1 ante una intensidad leve y heterogénea a 40x aumentos. La puntuación de 0 quedó para aquellas células sin tinción visible en las que las células estromales sí mostraban tinción (Figura 13).

Figura 13. Evaluación inmunohistoquímica de la expresión de TFAP2E. En color marrón se visualiza la expresión del marcador. Arriba izquierda: inexpressión de TFAP2E; Arriba derecha: puntuación de 1, por expresión débil y heterogénea; Abajo izquierda: puntuación de 2, ante expresión fuerte pero heterogénea y finalmente puntuación de 3 ante expresión fuerte y homogénea de TFAP2E.



3. Análisis estadístico

Las variables continuas se representaron mediante la media \pm DE, mientras que las categóricas figuran como frecuencias o porcentajes. Se comparó el riesgo de supervivencia global (SG) y de supervivencia libre de enfermedad (SLE) mediante test chi-cuadrado. El test log-Rank se empleó para estudiar de un modo univariable las diferencias en supervivencia por tiempo en el estudio, ilustrándolas mediante curvas de Kaplan Meier, mientras que para el análisis multivariante se confeccionó un modelo de regresión de Cox. Se consideró como significativo un p valor bilateral < 0.05 .

Universidad de Alicante

6. Resultados

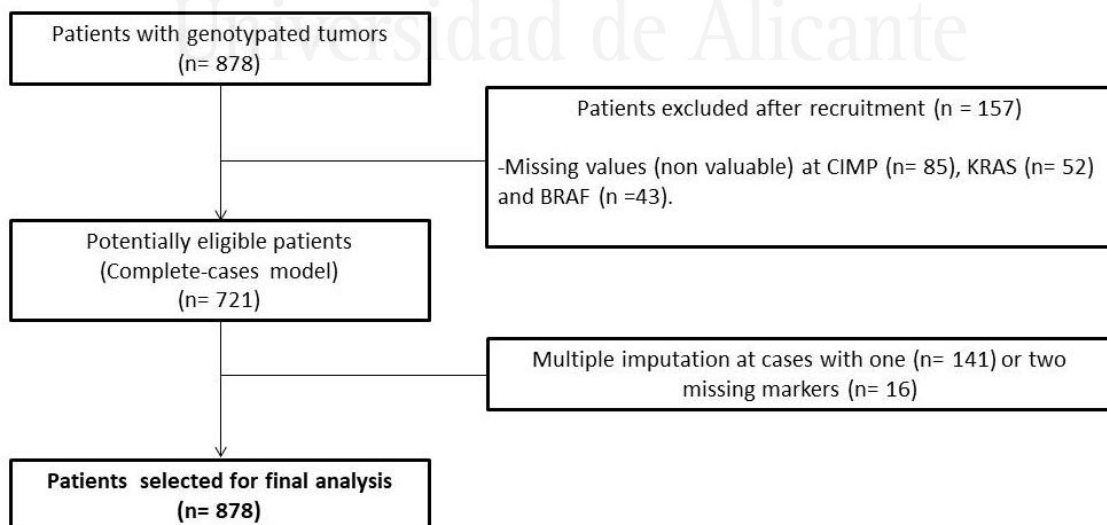
En este apartado se expone un resumen por separado de los resultados de los dos artículos incluidos como parte de la tesis.

Artículo 1

Murcia et al. "Colorectal cancer molecular classification using BRAF, KRAS, microsatellite instability and CIMP status: Prognostic implications and response to chemotherapy". PLOS One 2018. 13-9.

De los 878 pacientes incluidos, el análisis de los 4 marcadores moleculares fue posible en 721. Los casos que incluían uno o dos marcadores moleculares perdidos se completaron mediante el modelo de imputación múltiple mencionado previamente del mismo modo que en el artículo en el que se basa el estudio (Figura 14). La mediana de seguimiento del conjunto de la muestra fue de 52 meses (RIq 16-64).

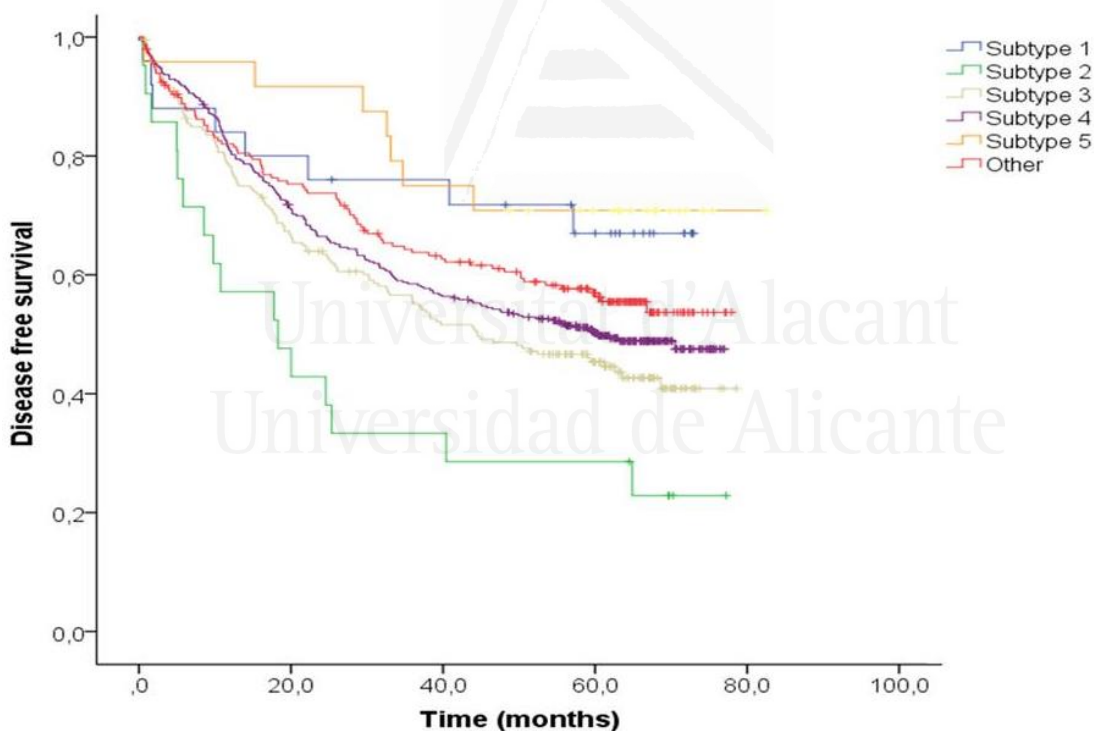
Figura 14. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el presente estudio.



De modo descriptivo, el 77% de los pacientes pudo ser clasificado en algún subtipo con la siguiente distribución: 25 en el subtipo 1 (3%), 22 en el subtipo 2 (3%), 218 en el subtipo 3 (25%), 388 pacientes en el subtipo 4 (44%) y, finalmente, 24 (3%) en el subtipo 5.

La mediana de edad y distribución por sexo fue similar entre los 5 subtipos, presentando únicamente el subtipo 5 una cifra algo menor y mayor prevalencia en mujeres. La mayor parte de los tumores fueron diagnosticados en estadios II o III en todos los subtipos, mostrando una predisposición por el lado derecho algo mayor en el subtipo 1 y por el izquierdo en los subtipos 3 y 4. En la sección “Trabajos Publicados” se puede consultar la tabla 2, que contiene las diferentes características clínicas de los pacientes según el subtipo al que pertenecen.

Figura 15. Supervivencia libre de enfermedad al final del seguimiento para los diferentes subtipos, representada mediante curvas de Kaplan Meier.

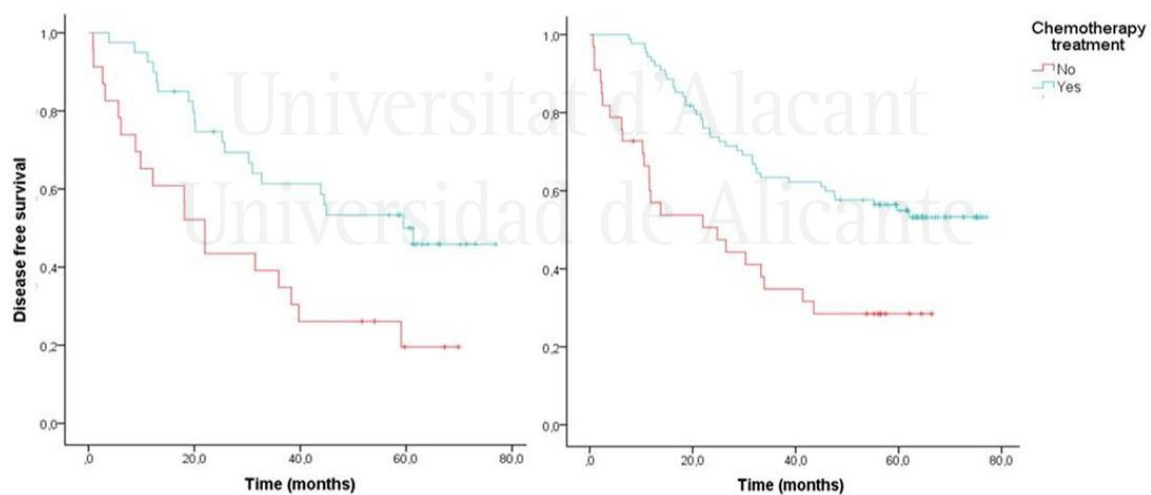


En términos pronósticos, la representación mediante curvas de Kaplan Meier (Figura 15) muestra las diferencias en TSLE, en el que el subtipo 2 muestra al final del seguimiento una supervivencia inferior al 30%. En el polo opuesto, el subtipo 5 presenta la mejor tasa de supervivencia, por encima del 80% ($p < 0.001$). Al realizar el ajuste en el análisis multivariante, tanto la edad como el sexo y el estadio TNM influyeron de manera

significativa en el TSLE ($p < 0.001$ en todos ellos). En este análisis, tomando como referencia el subtipo 4 por ser el mayoritario, únicamente el subtipo 2 presentaba un pronóstico claramente diferente a éste ($p = 0.03$).

El análisis del TSLE en pacientes con tumores en estadios II de mal pronóstico o III se llevó a cabo en 324 sujetos. De ellos, 114 no recibieron tratamiento con quimioterapia. Al comparar los tratados frente a los restantes, se observó una clara diferencia en términos de supervivencia en favor del grupo que recibió QT ($p < 0.001$) en el análisis univariante. Al estratificar por subtipos, únicamente el 3 y 4 mostraron beneficios al recibir fármacos quimioterápicos ($p = 0.003$ para el subtipo 3 y $p < 0.001$ para el subtipo 4) (Figura 16), mostrando el subtipo 2 una tendencia a la mejoría, pero de modo no significativo ($p = 0.068$). El análisis multivariante definió un mayor TSLE sólo para el subtipo 4 (0.005) tras ajustar por edad, sexo y estadio TNM.

Figura 16. Supervivencia libre de enfermedad para los subtipos 3 (izquierda) y 4 (derecha), según reciban o no quimioterapia.

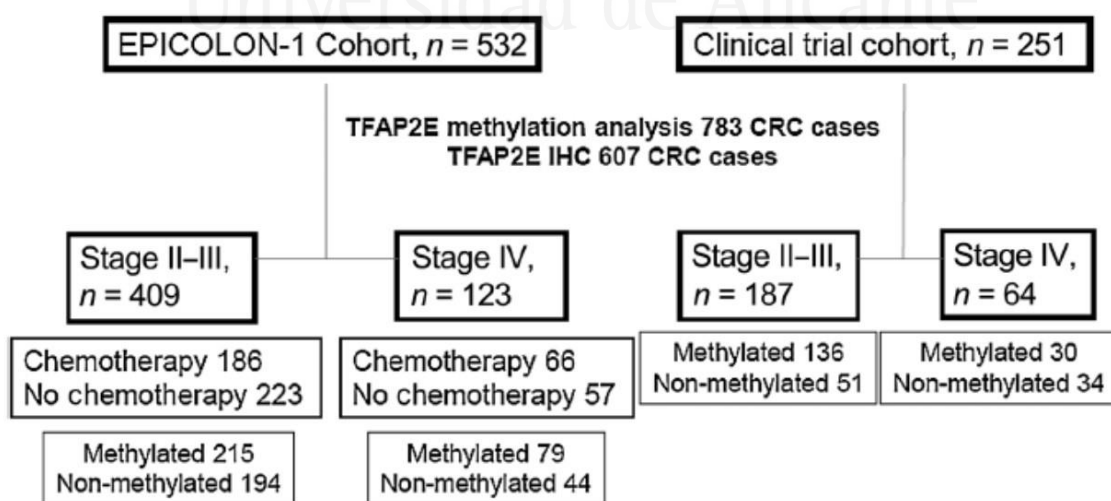


Artículo 2

Murcia et al. "TFAP2E Methylation and Expression Status Does Not Predict Response to 5-FU-based Chemotherapy in Colorectal Cancer". Clin Cancer Res. 2018 Jun 15;24(12):2820-2827.

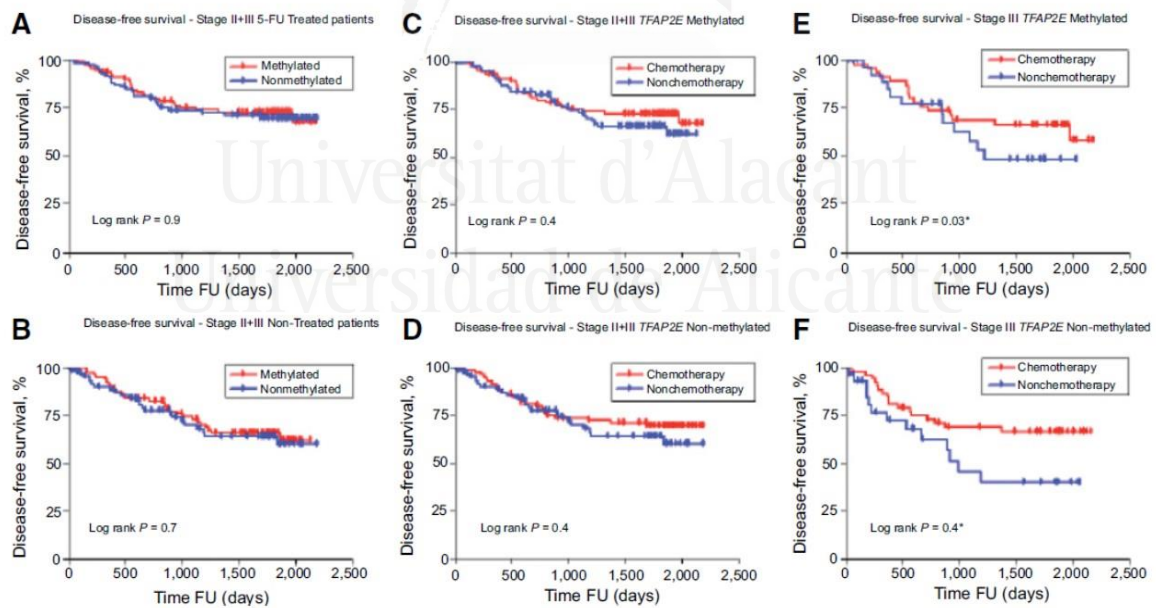
De los 783 pacientes incluidos, el 59% aproximadamente presentaban hipermetilación en el gen TFAP2E, principalmente en el intrón 3. La comparación del grado de metilación de TFAP2E en tejido tumoral frente a mucosa sana fue significativamente mayor en el primer grupo ($p < 0.001$). En él, para evaluar la correlación entre la metilación de TFAP2E y la expresión de la proteína homóloga, se realizó un análisis por IHQ sobre muestras de CCR embebidas en parafina. Este análisis fue posible en 607 muestras (varios pacientes aportaban más de una muestra) de la cohorte EPICOLON-1, observando expresión en el 66% de las muestras. Únicamente el 40% de los tumores hipermetilados mostraron una pérdida de expresión proteica, y a la inversa: el 74% de los tumores con hipometilación en TFAP2E conservaron su expresión por inmunohistoquímica (Figura 17).

Figura 17. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el presente estudio.



La influencia que la metilación en TFAP2E pueda ejercer en el pronóstico y la respuesta a la quimioterapia fue evaluada en las cohortes EPICOLON-1 y cohorte clínica. En estadio metastático, la cohorte EPICOLON-1 mostró una supervivencia global similar en 123 pacientes al dividirlos según presentasen TFAP2E metilado o no (HR= 1.21; p= 0.6). La repetición de este análisis en el subgrupo de 43 pacientes que recibieron un tratamiento basado en 5-FU, mostró nuevamente una supervivencia similar (HR=0.68; p=0.3). Más aún, la quimioterapia mejoró la supervivencia global tanto en pacientes con y sin metilación en TFAP2E (HR=0.58; P= 0.04 y HR= 0.39; p= 0.01, respectivamente). Del mismo modo, la cohorte clínica incluyó 64 pacientes con CCR en estadio metastático en tratamiento con régimen FOLFOX, y no hubo diferencias en la supervivencia global según existiese o no metilación (HR= 0.89; p= 0.7).

Figura 18. Tiempo de supervivencia libre de enfermedad en estadios II y III, cohorte EPICOLON, agrupados según el tratamiento recibido o según la metilación de TFAP2E.



En estadios potencialmente curativos (II y III), los resultados obtenidos en ambas cohortes fueron muy similares también, aunque con alguna pequeña diferencia (Figura 18). De 409 pacientes, la cohorte EPICOLON-1 albergaba 177 con tratamiento basado en 5-FU. En este

subgrupo, la supervivencia libre de enfermedad fue similar en pacientes con tumores metilados en TFAP2E frente a los no metilados (HR= 0.91; p= 0.9). Al estratificar según fuesen pacientes en estadio II (p= 0.7) o estadio III (p= 0.9), tampoco hubo diferencias. En estadio III, al igual que en CCR metastásico, la supervivencia libre de enfermedad mejoró tanto en pacientes con tumores metilados (p= 0.03) como sin metilar (p= 0.04). Respecto a la cohorte clínica, los 187 pacientes con CCR en estadios II o III recibieron tratamiento con 5-FU. A diferencia de lo observado en la cohorte previa, aquellos con tumores metilados presentaron de modo global peor supervivencia que los que no la presentaban (p= 0.03). No obstante, al estratificar por estadio, esta diferencia se mantuvo para el estadio II (p= 0.01), pero no para el estadio III (p= 0.2).

Por último, la cohorte clínica objetivó que la metilación aberrante de TFAP2E se asociaba con mayores tasas de recurrencia temprana tras cirugía y tratamiento adyuvante en el conjunto de pacientes con tumores en estadios II y III (HR= 1.91; P= 0.045) y también en el subgrupo de pacientes con tumores en estadio II (HR= 1.9; P= 0.023), postulándose como un marcador con poder predictivo a este respecto.

7. Discusión

En los últimos años, la tendencia investigadora se orienta hacia una medicina personalizada en la que cada paciente sea manejado de acuerdo a sus características biológicas. La “receta” del éxito de esta medicina parece hallarse en gran parte en el DNA nuclear, conteniendo secuencias de genes establecidas como “normales” o con alguna alteración a nivel somático o germinal que pueda codificar posteriormente una proteína alterada. Los genes que presenten estas mutaciones darán lugar a proteínas que no ejerzan sus funciones adecuadamente, ya sea como parte de una vía de señalización intracelular, regulando la expresión génica o la división celular, metabolizando fármacos para convertirlos en metabolitos activos, etc...

En el pasado, cuestiones sobre la falta de eficacia de algunos tratamientos en una parte de la población carecía de respuesta científica. En cambio, hoy día se sabe, por ejemplo, que los tumores con inestabilidad de microsatélites responden peor a la quimioterapia que aquellos sin esta alteración. Del mismo modo, los pacientes con CCR y mutación en KRAS presentan una nula respuesta a tratamientos con fármacos anti-EGFR, los tumores con mutación en BRAF presentan un pronóstico sombrío, etc... Los artículos presentados como parte de esta tesis siguen esta línea, en busca de marcadores que puedan ayudarnos a elegir el mejor manejo de un paciente afecto de CCR.

A la luz de los resultados expuestos, el análisis de biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento en el CCR parece útil y pertinente. Al igual que se sugirió inicialmente en los estudios publicados por Phipps y Sinicrope, la clasificación molecular basada en el análisis de BRAF y KRAS, la presencia de inestabilidad de microsatélites y fenotipo metilador objetiva diferencias en el pronóstico de los pacientes. Los resultados confirman la pobre supervivencia de aquellos pacientes con mutación en BRAF y alto nivel de metilación cuando se unen a la presencia de tumores estables en los microsatélites (subtipo 2), evolucionando de un modo muy diferente cuando lo hacen con tumores inestables (subtipo 1). Este pronóstico tan dispar parece tener explicación al observar la respuesta inmunitaria adaptativa presente.

Los tumores se encuentran embebidos en un microambiente inmunitario compuesto por linfocitos T principalmente, actuando a modo de “barrera” frente a las células neoplásicas. En aquellos tumores con una potente respuesta de este tipo, las células inmunes actúan a modo de contención frenando la progresión y diseminación tumoral. Los tumores colorrectales del subtipo 1 expresan proteínas codificantes de citocinas, interferón-gamma (inductor de células Tc), CTL4, PD1 (empleado por las células tumorales como mecanismo de escape), PDL-1, HLA-1, etc... desencadenando una proliferación local de la respuesta inmune adaptativa principalmente. Esta es la razón por la que aquellos tumores con amplia respuesta inmune, como ocurre en los subtipos con inestabilidad de microsatélites, 1 y 5, presentan mejor pronóstico.

En la misma línea, actuando sobre dianas moleculares que posibilitan el escape a dicha respuesta, se impedirá con mayor efectividad la extensión tumoral. Por ello, fármacos que inhiben por ejemplo la diana PD-1 como mecanismo de escape de la respuesta inmunitaria, tienen un efecto antineoplásico en aquellos tumores que expresan dicha molécula, como es el caso de estos tumores con inestabilidad de microsatélites. Es por ello que el pembrolizumab es un fármaco altamente efectivo en este subgrupo de pacientes.

Tanto el subtipo 1 como el 2 de CCR incluyen tumores que se desarrollan a través de la vía serrada de carcinogénesis, previamente expuesta. Sería lógico pensar pues que el pronóstico fuese similar en ambos casos. En cambio, a la luz de los resultados obtenidos, existe una enorme diferencia, mostrando el subtipo 1 un pronóstico mucho más parecido al que presenta el subtipo 5, que sigue la vía familiar de inestabilidad de microsatélites. Por tanto, esto sugiere que el pronóstico de un paciente viene dado en mayor medida por las alteraciones genético-moleculares del tumor subyacente, y no por la vía carcinogénica por la que se desarrolla.

El subtipo 3 incluye un conjunto de tumores de diferente origen carcinogénico (en parte de la vía serrada y en parte de la vía de inestabilidad cromosómica) pero con un marcador común: la presencia de mutación en KRAS. En términos pronósticos, estos pacientes

presentan una pobre supervivencia a 5 años de no recibir tratamiento alguno, principalmente porque la presencia de mutaciones en KRAS indica en muchas ocasiones, sobre todo en tumores desarrollados a través de la vía CIN, un estadio tumoral avanzado. Por su parte, el subtipo 4 engloba a aquellos tumores que únicamente siguen precisamente la vía de la inestabilidad cromosómica, pero con la diferencia de que no existe alteración alguna en los 4 marcadores estudiados. Comprende la gran mayoría de CCR y su pronóstico, en comparación con los otros subtipos, se encuentra en un nivel medio.

Según el conocimiento de los autores en el momento de la publicación, el artículo 1 es el primero que trata de validar los resultados obtenidos por Phipps y colaboradores, que estudiaron el pronóstico dividiendo el CCR en 5 subtipos moleculares. Este artículo ha pretendido dar un paso más y evaluar también la respuesta a la quimioterapia convencional basada en 5-FU según el subtipo correspondiente. Los resultados indican que los subtipos más frecuentes, el 3 y el 4, presentan una respuesta adecuada al tratamiento con QT en términos de supervivencia libre de enfermedad, en el análisis univariante. Este hecho se mantiene sólo para el subtipo 4 en el análisis multivariante. Desafortunadamente, el pequeño tamaño muestral de los subtipos 1, 2 y 5 impide obtener resultados y conclusiones sólidas, en tanto que el subtipo 2 sí que muestra una tendencia a una mayor, pero no significativa, supervivencia libre de enfermedad ($p=0.068$). Por ello, se precisaría de cohortes con tamaños muestrales más grandes, especialmente en esos subtipos minoritarios, para poder evaluar correctamente el papel de la quimioterapia convencional y de otras terapias dirigidas en los diferentes subtipos de CCR.

Una de las principales limitaciones de este estudio es precisamente un insuficiente tamaño muestral en algunos subgrupos. Pese a que la muestra total incluye casi 900 sujetos, la mayor parte de ellos pertenecen a los subtipos 3 y 4, que incluyen pacientes con CCR con inestabilidad cromosómica y algunos tumores pertenecientes a la vía serrada. En estos pacientes, principalmente los primeros, la respuesta adecuada al 5-FU en sus diversos regímenes ya ha sido demostrada con anterioridad. En cambio, la respuesta en tumores que siguen la vía serrada continúa siendo una incógnita. Inicialmente, al vincularse la vía serrada exclusivamente a la presencia de metilación aberrante, los trabajos publicados

trataban de enlazar este fenotipo con una determinada respuesta a la quimioterapia.(82) Los resultados obtenidos fueron tan dispares que obligaba a replantear si cabía la posibilidad de que otras variables explicasen esas diferencias. Tras añadir al análisis la presencia de mutaciones en BRAF y KRAS, así como la inestabilidad de microsatélites y alteraciones en otros genes, se establecían 3 subgrupos diferentes dentro de la propia vía serrada (los subtipos 1,2 y 3, Figura 7 en el apartado 1.2.2). La respuesta a la quimioterapia convencional en pacientes con CCR del subtipo 3 es moderadamente satisfactoria, indicando una mayor supervivencia libre de enfermedad, si bien únicamente en el análisis univariante. En cambio, los subtipos 1 y 2 presentan un tamaño muestral muy escaso, de apenas 10 pacientes en estadios subsidiarios de recibir tratamiento con 5-FU. Por tanto, aunque posiblemente ésta fuese una de las principales motivaciones para la realización del presente estudio, no ha sido posible establecer una conclusión sólida sobre determinados subgrupos dentro de la vía serrada. Un caso idéntico sucede con el subtipo 5. Y aunque el subtipo 2 muestre una tendencia a una respuesta adecuada, no es posible aventurar ni su efectividad ni la falta de ella.

Aunque sea un método validado, la cumplimentación de los valores perdidos en los biomarcadores a través de un modelo de imputación múltiple genera controversia. Para la elaboración del mismo se ha tenido en cuenta cualquier variable que pudiera estar relacionada con el estado de un marcador o cualquiera que fuese a intervenir posteriormente a la hora de confeccionar un modelo multivariante. Existen dos métodos estándar de imputación múltiple: el modelo de especificación completamente condicional y el modelo de imputación multivariante normal, siendo este último el método empleado para el artículo 1. En base a él, se realizó un total de 25 rondas de imputación hasta obtener un modelo en el que la desviación respecto a los valores de referencia para cada marcador fuese mínimo (<0.1%). Este método estadístico tiene algunos detractores que indican que la fiabilidad de los resultados obtenidos no puede alcanzar en ningún caso la de los valores reales. No obstante, los resultados obtenidos aplicando la imputación múltiple frente al modelo con valores perdidos apenas difieren, puesto que el tamaño muestral de los subtipos minoritarios continuó siendo insuficiente. Además, aquellos resultados

significativos en el modelo con imputación múltiple ya presentaban significación en el modelo con casos incompletos (véase el anexo 1).

Otra limitación de este artículo está en relación con la propia clasificación. Si bien se ha tratado de reproducir fielmente las diferentes combinaciones para cada subtipo según lo propuesto por Phipps y Sinicrope, el 29% de los pacientes queda relegado a un grupo aparte al no poseer un CCR con una de las 5 combinaciones propuestas (subtipo “no clasificables”). Existen dos posibles explicaciones para este fenómeno. La primera de ellas es que la biología del CCR no pueda ser considerada como un compartimento estanco perfecto, en el que cada vía carcinogénica contenga irremediablemente una firma propia de alteraciones. En este caso, ciertos eventos en un momento dado pueden llevar a la aparición de una alteración no esperada o que no correspondería teóricamente para esa vía carcinogénica. La segunda es que puedan existir otras vías carcinogénicas no descritas hasta el momento, que posean características genético-moleculares propias, pero con cierto solapamiento con las ya conocidas.

Es importante mencionar que la decisión de dar quimioterapia a un paciente ha sido basada en el criterio del oncólogo, lo que introduce un sesgo de selección. Por un lado, es posible que se haya seleccionado a aquellos pacientes más jóvenes y con mejor performance status en el momento de decidir el tratamiento por presuponer un menor deterioro clínico a consecuencia de los posibles efectos adversos de la quimioterapia. Por otro lado, la existencia de un grupo de pacientes que no recibiesen dichos fármacos permitía la comparación dentro de cada subtipo entre pacientes con tratamiento vs no tratados, traduciéndose en una fortaleza de este estudio no explorada previamente en otros trabajos por consideraciones mayormente éticas.

Por último, cabe reseñar que la proporción de tumores con alto nivel de metilación en el artículo 1 es algo mayor que en el resto de estudios que analizan dicha variable. Es probable que este hallazgo esté relacionado con la edad media de la muestra del estudio, puesto que el 60% de los pacientes son mayores de 70 años.(144) Existen dos tipos de metilación, difícil de distinguir en muchas ocasiones: la metilación tipo A, relacionada con la edad avanzada, y la tipo C, relacionada con procesos tumorales. En nuestro caso, es

posible que exista cierto solapamiento entre ambas que no es posible diferenciar con las técnicas empleadas.

Tal y como se mencionó en el apartado “Biomarcadores con poder pronóstico y predictivo en el cáncer colorrectal”, los diferentes métodos para evaluar el fenotipo metilador pueden tener un papel determinante en la heterogeneidad de los resultados de los diferentes estudios. En función del pretratamiento que se realice del DNA, existen 3 grupos de técnicas que evalúan su metilación:

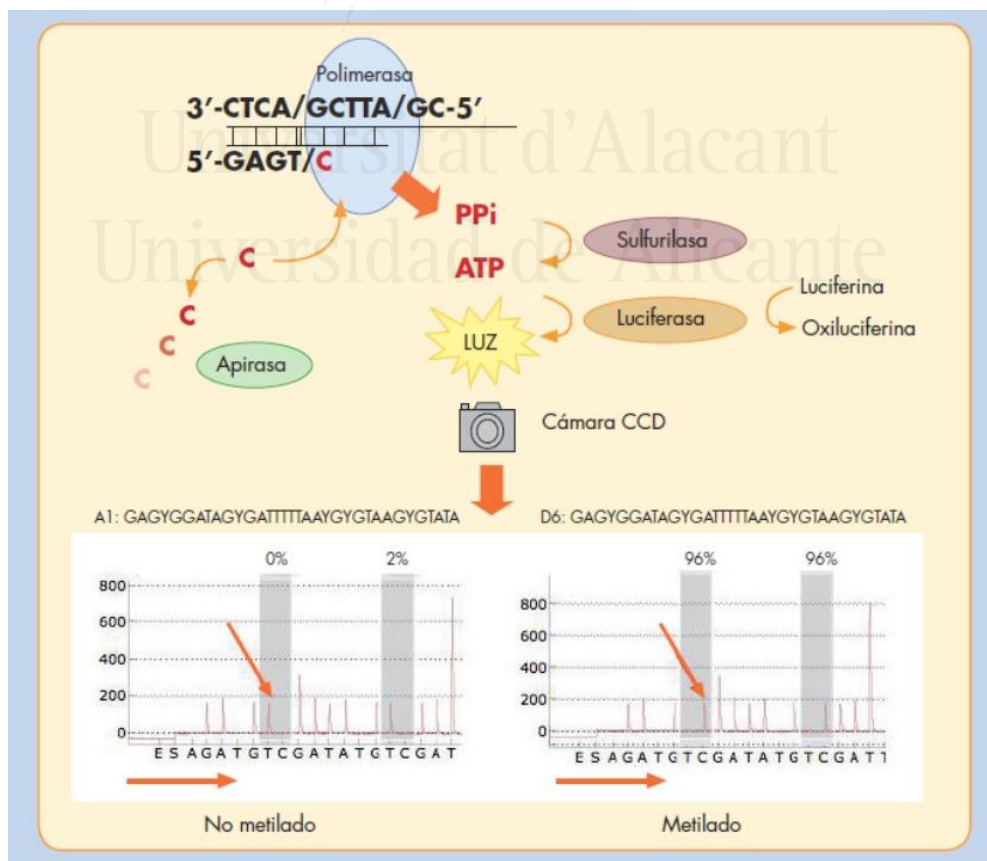
- Tratamiento previo con bisulfito sódico
- Tratamiento con endonucleasas
- Enriquecimiento por afinidad

Las dos técnicas empleadas para estudiar la hipermetilación en los artículos de la presente tesis están incluidos en el primer grupo, y son la técnica MetyLight y la pirosecuenciación. En ambas se realiza una PCR para amplificar tanto las muestras metiladas como no metiladas. El tratamiento del DNA con bisulfito sódico convierte las citosinas no metiladas en uracilos (y por tanto timinas tras la reacción de PCR), sin modificar las citosinas metiladas.(145,146) Esta modificación convierte un fenómeno epigenético en una diferencia genética y, en consecuencia, analizable mediante diferentes técnicas.

Methylight se basa en una PCR cuantitativa a tiempo real mediante sondas TaqMan. La sonda fluorescente tan solo hibrida en la región metilada, por lo que la intensidad de la fluorescencia irá en consonancia con la cantidad de alelos metilados. Es una técnica altamente sensible, siendo capaz de detectar hasta 1 alelo metilado de 10.000, que además permite diferenciar metilación mono y bialélica en ciertos genes como MLH-1. No obstante, requiere para su realización de un control 100% metilado como calibrador. Sin embargo, pese a que se ha mantenido como técnica gold-estándar durante muchos años para el estudio de la metilación, ciertos inconvenientes merecen ser tenidos en cuenta:

- Se trata de una técnica costosa por requerir una infraestructura avanzada y no disponible en todos los laboratorios, así como por el coste de ciertos materiales tales como las sondas marcadas con fluoróforos.
- La resolución es baja puesto que no se obtiene información de cada CpG por separado.
- La necesidad de pre-tratamiento químico del DNA mediante bisulfito, con su correspondiente baja estabilidad, conllevan que en muchas ocasiones los resultados puedan ser dispares.
- Consecuencia del pre-tratamiento, la cantidad de DNA necesaria sea es de alrededor de 500-1000 ng, mayor que en otras técnicas más actuales como MS-MLPA.

Figura 19. Esquema de pirosecuenciación sobre DNA bisulfitado. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados. Ilustración tomada de “Balaguer F, Moreira L. Epigenómica. Gastroenterología y Hepatología Continuada. 2010”.



Por su parte, la pirosecuenciación también se trata de un método cuantitativo que se realiza sobre DNA bisulfitado. Emplea la secuenciación por síntesis, en la que la acción de un cebador sobre una cadena simple de DNA va produciendo la adición de nucleótidos. Cada nucleótido añadido producirá una molécula de pirofosfato, que finalmente, tras la conversión por luciferasa, dará lugar a energía lumínica. En consecuencia, cuantos más nucleótidos se añadan, se detectará más luz en el secuenciador. Dado que el tratamiento con bisulfito produce un polimorfismo C/T en el lugar en que se hallaba la isla CpG, tras la PCR será posible cuantificar sobre un total de 50 pares de bases qué porcentaje de esa isla CpG presenta metilación (Figura 19).

El artículo 1 de esta tesis emplea la misma metodología para evaluar CIMP que el estudio en el que se basa: una PCR cuantitativa con tratamiento químico previo del DNA con bisulfito sódico.(131) Tal y como se ha expuesto y discutido, los resultados son muy similares en términos pronósticos. Por tanto, es probable que la diferente proporción de pacientes con tumores metilados se deba a otros aspectos, tales como la edad. En este sentido, las edades medias de los diferentes subtipos en el estudio de Phipps oscilan entre 56-67 años, mientras que en el artículo 1 se sitúan entre 72-74 años.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que dividir el CCR en subtipos basados en características genético-moleculares permite la estratificación del pronóstico del paciente según la combinación de las mismas. Además, aquellos pacientes con CCR del subtipo 3, y principalmente 4, responden a la QT basada en 5-FU. No resulta posible discernir si existe una respuesta adecuada en los otros subtipos dado su escaso tamaño muestral, si bien el subtipo 2 muestra una tendencia a la mejoría. Por tanto, estudios futuros con mayor tamaño muestral, unidos a nuevas determinaciones genéticas descubiertas y una mejor comprensión de la biología del CCR, podrán determinar la respuesta a fármacos para cada paciente según el perfil genético tumoral.

Los resultados aquí expuestos y discutidos hacían referencia al poder predictivo de ciertas alteraciones genético-moleculares sobre la respuesta a la quimioterapia. El artículo 2 en cambio trata de valorar si, concretamente, la metilación aberrante del gen TFAP2E pueda

poseer tal capacidad y sea suficiente a la hora de decidir proporcionar un tratamiento con 5-FU. La información previa disponible al respecto se basa en estudios de escaso tamaño muestral y en un ensayo clínico. Park y cols observaron que en CCR en estadios I-III, existía una correlación entre la metilación de dicho gen y el pronóstico del paciente, independientemente del tratamiento aportado.(147) Ebert y cols prosiguieron con dicha idea y presentaron un ensayo clínico en el que tal alteración pronosticaba una mala respuesta al tratamiento con 5-FU en sus distintos regímenes. Sin embargo, tal y como se ha comentado previamente, ciertos aspectos del diseño de este ensayo podrían afectar a su validez externa. Entre ellos, una cohorte de pacientes heterogénea y relativamente pequeña para el objetivo del trabajo, tratados con distintas combinaciones de 5-FU y de un modo no estandarizado. La potencial aplicabilidad traslacional a la práctica clínica podría tener tal trascendencia que previamente cabría reproducir y validar estos resultados con un estudio de diseño más robusto y en una cohorte de pacientes más amplia, previo paso a la validación en una cohorte prospectiva.

El artículo 2 trata de reproducir estos hallazgos en dos cohortes independientes: una perteneciente a un estudio poblacional y la otra como parte de un ensayo clínico. Sus principales conclusiones son dos: primera, la hipermetilación del gen TFAP2E no se asocia con una pobre expresión de su proteína homóloga; y segunda, ni la hipermetilación ni la falta de expresión de dicha proteína conlleva una mejor o peor respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU.

La primera de estas afirmaciones se evaluó únicamente en la cohorte de base poblacional, analizando un total de 607 tumores colorrectales. De estos, el 66% expresaban el gen TFAP2E mediante análisis por inmunohistoquímica. Y pese a que teóricamente la hipermetilación condicionaría una falta de expresión de la proteína en cuestión, esta situación se daba únicamente en el 40% de los tumores metilados en TFAP2E. Inversamente, casi el 75% de los tumores hipometilados en este locus presentaban una pobre expresión de esta proteína. Es por ello que la correlación entre ambos eventos impresiona de inexistente. Cierto es que cuando se compara tumor vs mucosa adyacente normal existe una clara diferencia en términos de metilación en favor del primero. No obstante, esto no se traduce en una pobre expresión de TFAP2E, permaneciendo la

hipermetilación de este gen como un evento estocástico y no influyente en la posterior traducción proteica. Se hipotetiza que es posible que el análisis del intrón 3 de este gen pueda no pertenecer a una región reguladora. A este respecto, la metilación de intrones se ha asociado en varios trabajos con *splicing* alternativo y regulación de regiones no codificantes del DNA, pero no de un modo claro con el silenciamiento genético, más relacionado con el intrón 1.(148–150) Otra de las explicaciones posibles es que acontezcan cambios tras la traducción de RNA a proteína que expliquen las discrepancias entre la expresión de TFAP2E y la metilación de dicho gen.

El segundo punto, y principal objetivo del trabajo, se evaluó en ambas cohortes, y separando los estadios potencialmente curativos por un lado y aquellos tumores metastásicos por otro. La cohorte procedente del ensayo clínico objetivó que en estadio IV, tras un tratamiento con FOLFOX de los 64 pacientes integrantes, la supervivencia global era similar tuvieran o no hipermetilado el gen TFAP2E. Por el contrario, el análisis de 187 pacientes en estadios II o III mostraba que aquellos que recibían tratamiento con 5-FU presentaban un mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad si no existía metilación en dicho gen. No obstante, cabe recalcar que cuando se separaban pacientes con estadios II o III, este hecho se mantenía únicamente en los primeros. Es importante señalar que, salvo este último hallazgo, el resto van en contra de lo expuesto en el artículo de Ebert y cols.(119) Además, la metilación de TFAP2E se erigió como un marcador pronóstico de recurrencia tras una resección con posterior tratamiento adyuvante en estadios II-III y II.

Los resultados obtenidos en la cohorte poblacional EPICOLON 1 son similares en los 123 pacientes con CCR metastásico. En ellos, la supervivencia global no sólo no mostró diferencias al recibir tratamiento con 5-FU según albergasen metilación o no en TFAP2E, sino que mejoró en ambos grupos. Por tanto, parece que en estadio metastásico no existe una ventaja añadida al analizar este gen. Este hecho se circunscribe al comparar el subgrupo que exprese la proteína por inmunohistoquímica. Y es que, tanto los pacientes que reciben QT como los que no, presentan supervivencias globales similares expresen TFAP2E o no lo hagan. Por lo tanto, según los resultados obtenidos en ambas cohortes, el

CCR metastásico no se beneficia en términos pronósticos ni de respuesta a QT por el hecho de analizar la metilación de TFAP2E.

En estadíos II y III, los pacientes que recibieron QT no presentaron diferencias en términos de supervivencia libre de enfermedad según existiese metilación o no, resultado que se mantiene al analizar los pacientes de ambos estadíos por separado. Tampoco las hubo al comparar pacientes que no recibieron QT. Y lo que es revelador, cuando se realizaba el análisis inverso, es decir, se comparaba según se recibiese tratamiento o no, tanto los que presentaban metilación como los que no mostraban supervivencias similares. Únicamente se observó mejoría en estadío III al recibir QT, pero tanto en tumores metilados como no metilados en TFAP2E. De un modo similar al estadío metastásico, la expresión de TFAP2E no influía en términos predictivos de respuesta a la QT con 5-FU. Todos estos resultados se sitúan levemente en contraposición a los mencionados en la cohorte previa. Concretamente, el mayor beneficio de la QT en estadío II ante la ausencia de metilación de TFAP2E se evidencia únicamente en la cohorte del ensayo clínico. Por una parte, ésta última contiene pacientes extraídos de un estudio con un diseño en la escala más alta de calidad de la evidencia. Sin embargo, el mayor tamaño muestral de la cohorte EPICOLON 1 unido a su diseño prospectivo confiere a este análisis una validez más que aceptable. Se podría concluir de este punto que, aunque algunos estudios objetivan lo útil que pueda resultar este biomarcador en estadío II, la ausencia de consenso al examinar otras cohortes dificulta ahondar en profundidad sobre este biomarcador con estudios prospectivos específicamente diseñados para ello. Más aún, teniendo en cuenta que en estadío III y IV no se observa beneficio alguno.

Pese a que la mayor parte de los resultados son opuestos a los del estudio que se pretende validar, el artículo 2 presenta algunas limitaciones. La principal de ellas en referencia al tratamiento con 5-FU. Mientras que en la cohorte del ensayo clínico no existe directamente un grupo de comparación que no reciba tratamiento con QT, en la cohorte observacional el tratamiento no se proporciona de un modo aleatorizado, sino en base a criterios clínicos. De un modo similar a lo acontecido en el artículo 1, es posible que aquellos pacientes con mejor *performance status* sean los que hayan recibido tratamiento, introduciendo un sesgo de selección. No obstante, no proporcionar un tratamiento demostrado como efectivo en

favor de proporcionar placebo no resulta ético ni viable hoy día en la práctica clínica. Ello, unido a un tamaño muestral satisfactorio y con la fortaleza de incluir pacientes bien seleccionados en sus respectivas cohortes, hace que las conclusiones obtenidas sean un reflejo real del papel de TFAP2E en términos predictivos. Cabe señalar también como limitación añadida que en algunos subgrupos de pacientes el tiempo de seguimiento es relativamente corto, pudiendo existir recurrencias de CCR a posteriori no detectadas.

En referencia a la técnica de análisis de la metilación, tanto el estudio de Ebert como el artículo 2 emplean la pirosecuenciación como método cuantitativo, previa modificación del DNA. Por ello, pese a la disparidad de los resultados obtenidos, resulta improbable que la razón se sitúe en relación con la metodología desarrollada y más probablemente en relación con los sesgos ya mencionados del estudio de Ebert.

Las conclusiones más importantes del artículo 2 indican que, aunque la metilación del intrón 3 del gen TFAP2E está relacionada con la existencia de un tumor, no se ha observado correlación inversa entre la metilación de este gen y su expresión proteica. Y lo que es más importante, no se ha demostrado clara y rotundamente que posea un efecto predictivo de respuesta a QT con 5-FU. Podría predecir una recurrencia temprana en estadio II, pero este hecho debe confirmarse en otros estudios enfocados hacia este punto con diseños adecuados.

En resumen, los resultados aportados por los dos artículos mencionados indican el potencial papel de los biomarcadores a la hora de tomar decisiones sobre el manejo del CCR. Estos resultados hacen referencia a aspectos genómicos y epigenómicos. Sin embargo, para comprender completamente el comportamiento y evolución natural de los diferentes tipos de CCR es preciso un conocimiento de otras vertientes. A este respecto, en 2015 se presentó otro sistema de clasificación consensuada del CCR, la clasificación CMS. Como se ha comentado previamente en el apartado 3 "Sistemas de clasificación del CCR basados en biomarcadores", esta clasificación engloba otros factores además de la genómica, tales como la metabolómica, transcriptómica y respuesta inmune tumoral.

En relación con este último punto concretamente, la respuesta que desencadena cada subtipo tumoral condiciona en gran medida pronóstico del paciente. Así, siguiendo esta clasificación CMS, el subtipo 1 presenta una respuesta muy florida, con cantidad de

macrófagos, monocitos, grandes poblaciones de células Tc y menor cantidad de células endoteliales y fibroblastos. Este microambiente con abundantes células Tc, producido en el contexto de un tumor hipermutador con inestabilidad de microsátélites y con epítomos altamente inmunogénicos, es responsable de que la evolución tumoral sea más lenta que en otros subtipos, como el CMS 4. También conocido como subtipo mesenquimal o inflamatorio, presenta gran cantidad de células endoteliales y fibroblastos, que traducen una mayor capacidad de infiltración linfovascular y remodelación de la matriz extracelular, permitiendo la migración de células tumorales hacia otros tejidos. También presenta gran infiltración linfocitaria, pero en este caso sin predominar las células Tc. Los tumores pertenecientes a este CMS 4 presentan por tanto una evolución más agresiva y auguran un pronóstico sombrío. Se sitúan en el contexto de enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Entre ambos extremos se situarían los CMS 2 y 3, pobremente inmunogénicos.

Resulta complicado correlacionar la clasificación propuesta por Phipps y validada en el artículo 1 de la presente tesis con la clasificación CMS, principalmente porque la primera se basa en eventos genéticos en acorde a las vías carcinogénicas y la segunda según la característica predominante (reprogramación del metabolismo celular en el CMS 3, con activación de la glutaminólisis y lipogénesis; tumores hipermutadores en el CMS 1, etc...). Las mutaciones en KRAS, situadas como marcador definitorio en nuestro subtipo 3, únicamente se encuentran en el 70% del CMS 3 y además se encuentran presentes en otros CMS.(133,151) Las mutaciones en BRAF predominan en el CMS 1, pero no en el 100% de los tumores. La metilación aún resulta más difícil de encuadrar, puesto que, aunque se sitúa preferentemente en el CMS 1, hasta en el 30% de los casos coexiste con inestabilidad de microsátélites en el CMS 3, un subtipo que se caracteriza además por seguir la vía de la inestabilidad cromosómica.

Es decir, la disparidad de criterios entre ambas clasificaciones hace difícil extrapolar una a otra. La ventaja de este sistema de clasificación CMS es que realiza un análisis exhaustivo de los tumores, a varios niveles, permitiendo una clasificación de hasta el 87% de los pacientes con CCR. Además, encuentra diferencias pronósticas, presentando el subtipo 4 la menor supervivencia libre de enfermedad y global. Como desventaja hay que mencionar

que, si lo que se pretende es conseguir un sistema de clasificación trasladable a la práctica clínica, ciertos subtipos no presentan marcadores moleculares concretos que permitan una identificación rápida. A este respecto, serían necesarios análisis profundos, costosos y no disponibles en la gran mayoría de centros, a fin de tratar de averiguar el subtipo al que pertenecen, para un sistema de clasificación cuya aplicabilidad traslacional no ha sido contrastada, al fin y al cabo. En este sentido, la clasificación validada en el artículo 1, aunque con sus limitaciones, impresiona de ser más trasladable a la práctica clínica.

Por otro lado, los miRNAs (micro-RNAs) abren una nueva frontera en el campo de la investigación de los biomarcadores predictivos en CCR. Un reciente trabajo expone una firma de 5 miRNA para la predicción de afectación ganglionar en pacientes sometidos a la extirpación endoscópica de un tumor en estadio T1 (miR-32, miR-181b-1, miR-193-b miR-195, miR-411).(152) El análisis con curvas ROC de este panel muestra para cada uno de estos miRNA un área bajo la curva de 0.71 a 0.76. La combinación de estos marcadores daba un área de 1.0, pero al incluir un tamaño muestral demasiado pequeño decidió ampliarse a los pacientes con tumores T2, quedando una más que aceptable área bajo la curva de 0.85. Este hallazgo fue validado posteriormente en otra cohorte de 150 pacientes, obteniendo una curva ROC con valor de 0.74 para predecir la existencia de afectación adenopática. Este resultado ha sido posteriormente validado en pacientes con afectación conocida y previamente a ser sometidos a cirugía, con un área bajo la curva de 0.77.

Por lo tanto, a la luz de lo expuesto queda que existe todavía un largo camino que recorrer en el campo de los biomarcadores en el CCR a la hora de ejercer una medicina de alta precisión a los pacientes con este tipo de tumores. Pese a que los marcadores genéticos comentados y discutidos en la presente tesis presentan un notable valor predictivo y pronóstico, existen muchos otros actualmente sometidos a estudio. Será prioritario encontrar aquel que prediga con la mayor precisión posible un escenario concreto.

8. Referencias

1. World Health Organisation, World Health Organization (WHO). Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Int Agency Res cancer. 2018;
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;
3. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update | Guía de práctica clínica. Diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal. Actualización 2018. Gastroenterol Hepatol. 2018;
4. Ahnen DJ. The American College of gastroenterology emily couric lecture the adenoma-carcinoma sequence revisited: Has the era of genetic tailoring finally arrived. American Journal of Gastroenterology. 2011.
5. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. Annals of Oncology. 2017.
6. Liu L, Zhuang W, Wang RQ, Mukherjee R, Xiao SM, Chen Z, et al. Is dietary fat associated with the risk of colorectal cancer? A meta-analysis of 13 prospective cohort studies. Eur J Nutr. 2011;
7. Lanza E, Yu B, Murphy G, Albert PS, Caan B, Marshall JR, et al. The polyp prevention trial-continued follow-up study: No effect of a low-fat, high-fiber, high-fruit, and -vegetable diet on adenoma recurrence eight years after randomization. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;
8. Leenders M, Siersema PD, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Boutron-Ruault MC, et al. Subtypes of fruit and vegetables, variety in consumption and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int J Cancer. 2015;
9. Ben Q, Zhong J, Liu J, Wang L, Sun Y, Yv L, et al. Association between consumption of fruits

- and vegetables and risk of colorectal adenoma a prisma-compliant meta-Analysis of observational studies. *Medicine (United States)*. 2015.
10. Keum NN, Lee DH, Greenwood DC, Zhang X, Giovannucci EL. Calcium intake and colorectal adenoma risk: Dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Int J Cancer*. 2015;
 11. Veettil SK, Ching SM, Lim KG, Saokaew S, Phisalprapa P, Chaiyakunapruk N. Effects of calcium on the incidence of recurrent colorectal adenomas: A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2017;
 12. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Vitamin B6 and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2010.
 13. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2015;
 14. Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, et al. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS ONE*. 2013.
 15. Luo S, Li JY, Zhao LN, Yu T, Zhong W, Xia ZS, et al. Diabetes mellitus increases the risk of colorectal neoplasia: An updated meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016;
 16. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012.
 17. Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Mons U, Jenab M, Freisling H, Bueno-de-Mesquita B, et al. Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: Meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med*. 2016;
 18. Figueiredo JC, Crockett SD, Snover DC, Morris CB, McKeown-Eyssen G, Sandler RS, et al. Smoking-associated risks of conventional adenomas and serrated polyps in the colorectum. *Cancer Causes Control*. 2015;
 19. Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ, et al. Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: Meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst*. 2009;

20. Chubak J, Kamineni A, Buist DSM, Anderson ML, Whitlock EP. Aspirin Use for the Prevention of Colorectal Cancer : An Updated Systematic Evidence Review for the U . S . Preventive Services Task Force. *Evid Synth.* 2015;
21. P.S. D, S. S, E. M, R. K, L.J. P, P.J. L, et al. Chemoprevention of colorectal cancer in individuals with previous colorectal neoplasia: Systematic review and network meta-analysis. *BMJ.* 2016;
22. Jung YS, Park CH, Eun CS, Park D II, Han DS. Metformin use and the risk of colorectal adenoma: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017;
23. Bonovas S, Filioussi K, Flordellis CS, Sitaras NM. Statins and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis of 18 studies involving more than 1.5 million patients. *J Clin Oncol.* 2007;
24. Dousset B, de Mestier P, Vons C. The Clinical Outcome of Surgical Therapy Study Group. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon Cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2050-2059. *J Chir (Paris).* 2012;
25. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: Analysis of 1001 consecutive cases. In: *Annals of Surgery.* 1999.
26. Leonard GD, Brenner B, Kemeny NE. Neoadjuvant chemotherapy before liver resection for patients with unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2005.
27. Investigators IMPA of BCCT (IMPACT B. Efficacy of Adjuvant Fluorouracil and Folinic Acid in B2 Colon Cancer. *J Clin Oncol .* 1999;
28. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2004.
29. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: Results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol.* 1993;
30. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *The Lancet.* 1995.

31. O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol.* 1997;
32. André T, Colin P, Louvet C, Gomelin E, Bouche O, Achille E, et al. Semimonthly versus monthly regimen of fluorouracil and leucovorin administered for 24 or 36 weeks as adjuvant therapy in stage II and III colon cancer: Results of a randomized trial. *J Clin Oncol.* 2003;
33. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL, et al. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: Results from National Surgical Adjuvant Breast. *J Clin Oncol.* 1999;
34. Leichman CG, Fleming TR, Muggia FM, Tangen CM, Ardalán B, Doroshow JH, et al. Phase II study of fluorouracil and its modulation in advanced colorectal cancer: A Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1995;
35. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med.* 2005;
36. Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: Results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2001;
37. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol.* 2009;
38. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, De Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol.* 2011;
39. Díaz-Rubio E, Tabernero J, Gómez-España A, Massutí B, Sastre J, Chaves M, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: Final report of the Spanish Cooperative Group for the treatment of digestive tumors tri. *J Clin Oncol.* 2007;

40. Saltz LB, Cox J V., Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus Fluorouracil and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2002;
41. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2000;
42. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone. as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000;
43. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;
44. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. High-dose bevacizumab improves survival when combined with FOLFOX4 in previously treated advanced colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study E3200. *J Clin Oncol.* 2017;
45. Van Cutsem E, Taberero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol.* 2012;
46. Taberero J, Yoshino T, Cohn AL, Obermannova R. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line {...}. *Lancet.* 2015;
47. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2009;
48. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Taberero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, Phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME study. *J Clin Oncol.* 2010;
49. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Randomized phase

- III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;
50. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013;
 51. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;
 52. van Lanschot MCJ, Carvalho B, Rausch C, Snaebjornsson P, van Engeland M, Kuipers EJ, et al. Molecular profiling of longitudinally observed small colorectal polyps: A cohort study. *EBioMedicine*. 2019;
 53. Jackman RJ, Mayo CW. The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet*. 1951;
 54. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990.
 55. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2015;
 56. Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;
 57. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* (80-). 2007;
 58. Leary RJ, Lin JC, Cummins J, Boca S, Wood LD, Parsons DW, et al. Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;
 59. Jover R, Payá A, Alenda C, Poveda MJ, Peiró G, Aranda FI, et al. Defective mismatch-repair colorectal cancer: Clinicopathologic characteristics and usefulness of immunohistochemical analysis for diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 2004;
 60. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of Clinical Oncology*. 2005.
 61. Hamida H, Lambrecht B. *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*. 2008;

62. Atlas TCGN, Muzny D, Bainbridge M, Chang K, Dinh H, Drummond J, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;
63. Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Thiagalingam S. Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Res*. 1997;
64. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* (80-). 1997;
65. Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon KH, Willis J, et al. Mutation of the type II transforming growth factor- β receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res*. 1998;
66. Jung B, Doctolero RT, Tajima A, Nguyen AK, Keku T, Sandler RS, et al. Loss of activin receptor type 2 protein expression in microsatellite unstable colon cancers. *Gastroenterology*. 2004;
67. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;
68. David Cunningham MD, Heinz-Josef Lenz MD, Lynch HT, Bruce Minsky MD, Bernard Nordlinger MD, Starling N. *Lancet Seminar: Colorectal cancer*. *Lancet*. 2012;
69. Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut*. 1998;
70. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001;
71. Ogino S, Brahmandam M, Cantor M, Namgyal C, Kawasaki T, Kirkner G, et al. Distinct molecular features of colorectal carcinoma with signet ring cell component and colorectal carcinoma with mucinous component. *Mod Pathol*. 2006;
72. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut*. 2006;
73. Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg*. 2000;

74. Salman P, Panay S, Fernández R, Mahave M, Soza-Ried C. Evidence of response to pembrolizumab in a patient with lynch syndrome-related metastatic colon cancer. *Oncotargets Ther.* 2018;
75. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: Molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. In: *Familial Cancer.* 2008.
76. Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Järvinen HJ, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer.* 2008;
77. Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, et al. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: A mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol.* 1999;
78. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology.* 2010;
79. Mojarad EN, Kuppen PJK, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench.* 2013.
80. Murcia O, Juárez M, Hernández-Illán E, Egoavil C, Giner-Calabuig M, Rodríguez-Soler M, et al. Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. *World J Gastroenterol.* 2016;22(13).
81. Haque T, Greene KG, Crockett SD. Serrated neoplasia of the colon: What do we really know? *Curr Gastroenterol Rep.* 2014;
82. Juo YY, Johnston FM, Zhang DY, Juo HH, Wang H, Pappou EP, et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology.* 2014.
83. Clancy C, Burke JP, Kalady MF, Coffey JC. BRAF mutation is associated with distinct clinicopathological characteristics in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Color Dis.* 2013;
84. Kalady MF, DeJulius KL, Sanchez JA, Jarrar A, Liu X, Manilich E, et al. BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *Dis Colon Rectum.* 2012;
85. Coppedè F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;

86. Brändstedt J, Wangefjord S, Nodin B, Eberhard J, Sundström M, Manjer J, et al. Associations of anthropometric factors with KRAS and BRAF mutation status of primary colorectal cancer in men and women: A cohort study. *PLoS One*. 2014;
87. Iacopetta B, Kawakami K, Watanabe T. Predicting clinical outcome of 5-fluorouracil-based chemotherapy for colon cancer patients: Is the CpG island methylator phenotype the 5-fluorouracilresponsive subgroup? *International Journal of Clinical Oncology*. 2008.
88. Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;
89. Jover R, Nguyen T, Prezcarbonell L, Zapater P, Pay A, Alenda C, et al. 5-fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2011;
90. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer*. 2009;
91. Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 2004;
92. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF Mutation Is Frequently Present in Sporadic Colorectal Cancer with Methylated hMLH1, but Not in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;
93. McGivern A, Wynter CVA, Whitehall VLJ, Kambara T, Spring KJ, Walsh MD, et al. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer*. 2004;
94. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, et al. IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. *Carcinogenesis*. 2010;
95. Thiel A, Ristimäki A. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. *Front Oncol*. 2013;
96. Lundberg I V., Burström AL, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Stenling R, et al. SOX2 expression is

- regulated by BRAF and contributes to poor patient prognosis in colorectal cancer. PLoS One. 2014;
97. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;
 98. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Final results from PRIME: Randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;
 99. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2009;
 100. Mao M, Tian F, Mariadason JM, Tsao CC, Lemos R, Dayyani F, et al. Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents. *Clin Cancer Res*. 2013;
 101. Yaeger R, Cercek A, O'Reilly EM, Reidy DL, Kemeny N, Wolinsky T, et al. Pilot trial of combined BRAF and EGFR inhibition in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2015;
 102. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010;
 103. Fearon ER. PM06CH20-Fearon Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;
 104. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ V., Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;
 105. Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, et al. KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res*. 2009;
 106. Wangefjord S, Sundström M, Zendeherokh N, Lindquist KE, Nodin B, Jirström K, et al. Sex differences in the prognostic significance of KRAS codons 12 and 13, and BRAF mutations

- in colorectal cancer: A cohort study. *Biol Sex Differ*. 2013;
107. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncologica*. 2014.
 108. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer . *N Engl J Med*. 2013;
 109. Tian S, Simon I, Moreno V, Roepman P, Tabernero J, Snel M, et al. A combined oncogenic pathway signature of braf, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. *Gut*. 2013;
 110. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011;
 111. Grady WM, Carethers JM. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008.
 112. Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, et al. Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. *Gastroenterology*. 2014;
 113. Limsui D, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. *J Natl Cancer Inst*. 2010;
 114. Balaguer F, Moreira L. Epigenómica. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*. 2010.
 115. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009;
 116. Ahn JB, Chung WB, Maeda O, Shin SJ, Kim HS, Chung HC, et al. DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. *Cancer*. 2011;
 117. Wang Y, Long Y, Xu Y, Guan Z, Lian P, Peng J, et al. Prognostic and predictive value of CpG island methylator phenotype in patients with locally advanced nonmetastatic sporadic colorectal cancer. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;

118. Han SW, Lee HJ, Bae JM, Cho NY, Lee KH, Kim TY, et al. Methylation and microsatellite status and recurrence following adjuvant FOLFOX in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2013;
119. Ebert MPA, Tänzer M, Balluff B, Burgermeister E, Kretzschmar AK, Hughes DJ, et al. TFAP2E–DKK4 and Chemoresistance in Colorectal Cancer . *N Engl J Med*. 2012;
120. You J, Nguyen A V., Albers CG, Lin F, Holcombe RF. Wnt pathway-related gene expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2008;
121. Xi Y, Formentini A, Nakajima G, Kornmann M, Ju J. Validation of biomarkers associated with 5-fluorouracil and thymidylate synthase in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2008;
122. Chung W, Kwabi-Addo B, Ittmann M, Jelinek J, Shen L, Yu Y, et al. Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. *PLoS One*. 2008;
123. Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2002;
124. Popovici V, Budinska E, Bosman FT, Tejpar S, Roth AD, Delorenzi M. Context-dependent interpretation of the prognostic value of BRAF and KRAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2013;
125. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, et al. Use of 5-Fluorouracil and Survival in Patients with Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2004;
126. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2003;
127. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;
128. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer: Prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2012;
129. Zaanani A, Shi Q, Taieb J, Alberts SR, Smyrk TC, Julie C, et al. Analysis of DNA mismatch repair (MMR) and clinical outcome in stage III colon cancers from patients (pts) treated

- with adjuvant FOLFOX +/- cetuximab in the PETACC8 and NCCTG N0147 adjuvant trials. *J Clin Oncol*. 2019;
130. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007.
 131. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology*. 2015;
 132. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. 2015;
 133. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;
 134. Van Cutsem E, Oliveira J. Primary colon cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2009;
 135. Benlloch S, Payá A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R, et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: Comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagnostics*. 2006;
 136. Guarinos C, Juarez M, Egoavil C, Rodriguez-Soler M, Perez-Carbonell L, Salas R, et al. Prevalence and characteristics of mutyh-associated polyposis in patients with multiple adenomatous and serrated polyps. *Clin Cancer Res*. 2014;
 137. 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*. 2006;
 138. 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. In: *Cancer Research*. 1998.
 139. Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Pihol V, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2007;

140. Jover R, Payá A. Inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal: Concepto, métodos de detección y utilidad clínica. *Gastroenterología y Hepatología*. 2003.
141. Gottfredson NC, Sterba SK, Jackson KM. Explicating the Conditions Under Which Multilevel Multiple Imputation Mitigates Bias Resulting from Random Coefficient-Dependent Missing Longitudinal Data. *Prev Sci*. 2017;
142. Piñol V, Andreu M, Castells A, Payá A, Bessa X, Jover R. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: A multicentre, prospective, nationwide study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;
143. Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Am Med Assoc*. 2005;
144. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JPJ. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res*. 1998;
145. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;
146. Schones DE, Zhao K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nature Reviews Genetics*. 2008.
147. Park SJ, Kim SM, Hong YS, Lee JL, Kim JE, Kim KP, et al. TFAP2E methylation status and prognosis of patients with radically resected colorectal cancer. *Oncol*. 2015;
148. Anastasiadou C, Malousi A, Maglaveras N, Kouidou S. Human Epigenome Data Reveal Increased CpG Methylation in Alternatively Spliced Sites and Putative Exonic Splicing Enhancers. *DNA Cell Biol*. 2011;
149. Malousi A, Kouidou S. DNA hypermethylation of alternatively spliced and repeat sequences in humans. *Mol Genet Genomics*. 2012;
150. Lin J, Lai M, Huang Q, Ma Y, Cui J, Ruan W. Methylation patterns of IGFBP7 in colon cancer cell lines are associated with levels of gene expression. *J Pathol*. 2007;
151. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature*

Reviews Cancer. 2017.

152. Ozawa T, Kandimalla R, Gao F, Nozawa H, Hata K, Nagata H, et al. A MicroRNA Signature Associated With Metastasis of T1 Colorectal Cancers to Lymph Nodes. Gastroenterology. 2018;



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Sección 2:

TRABAJOS PUBLICADOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Artículo 1

Referencia

Murcia O, Jover R, Egoavil C, Perez-Carbonell L, Juárez M, Hernández-Illán E, et al. TFAP2E methylation and expression status does not predict response to 5-FU-based chemotherapy in colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2018;

DOI: 10.1371/journal.pone.0203051

Resumen

Objective: The aim of this study was to validate a molecular classification of colorectal cancer (CRC) based on microsatellite instability (MSI), CpG island methylator phenotype (CIMP) status, *BRAF*, and *KRAS* and investigate each subtype's response to chemotherapy.

Design: This retrospective observational study included a population-based cohort of 878 CRC patients. We classified tumours into five different subtypes based on *BRAF* and *KRAS* mutation, CIMP status, and MSI. Patients with advanced stage II (T4N0M0) and stage III tumours received 5-fluoruracil (5-FU)-based chemotherapy or no adjuvant treatment based on clinical criteria. The main outcome was disease-free survival (DFS).

Results: Patients with the combination of microsatellite stable (MSS) tumours, *BRAF* mutation and CIMP positive exhibited the worst prognosis in univariate (log rank $P < 0.0001$) and multivariate analyses (hazard ratio 1.75, 95% CI 1.05-2.93, $P = 0.03$) after adjusting for age, sex, chemotherapy, and TNM stage. Treatment with 5-FU-based regimens improved prognosis in patients with the combination of MSS tumours, *KRAS* mutation and CIMP negative (log rank $P = 0.003$) as well as in patients with MSS tumours plus *BRAF* and *KRAS* wild-type and CIMP negative (log-rank $P < 0.001$). After adjusting for age, sex, and TNM stage in the multivariate analysis, only patients with the latter molecular combination had independently improved prognosis after adjuvant chemotherapy (hazard ratio 2.06, 95% CI 1.24-3.44, $P = 0.005$).

Conclusion: We confirmed the prognostic value of stratifying CRC according to molecular subtypes using MSI, CIMP status, and somatic *KRAS* and *BRAF* mutation. Patients with traditional chromosomally unstable tumours obtained the best benefit from adjuvant 5-FU-based chemotherapy.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Artículo 2

Referencia:

Murcia O, Jover R, Egoavil C, Perez-Carbonell L, Juárez M, Hernández-Illán E, et al. TFAP2E methylation and expression status does not predict response to 5-FU-based chemotherapy in colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2018;

DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2940

Resumen

Purpose: A recent study reported that 5-fluorouracil (5FU)-based chemotherapy is less effective in treating advanced colorectal cancer (CRC) patients demonstrating hypermethylation of *TFAP2E* gene. The aim of our study was to confirm and validate these findings in large, uniformly treated, well-characterized patient cohorts.

Experimental design: Two cohorts of 783 CRC patients: 532 from a population-based, multicenter cohort (EPICOLON I) and 251 patients from a clinic-based trial were used to study the effectiveness of *TFAP2E* methylation and expression as a predictor of response of CRC patients to 5FU-based chemotherapy. DNA methylation status of the *TFAP2E* gene in CRC patients was assessed by quantitative bisulfite pyrosequencing analysis. IHC analysis of the TFAP2E protein expression was also performed.

Results: Correlation between TFAP2E methylation status and IHC staining was performed in 607 CRC. Among 357 hypermethylated tumors, only 141 (39.6%) exhibited loss of protein expression. Survival was not affected by *TFAP2E* hypermethylation in stage IV patients (HR 1.21; 95% CI 0.79-1.87; log rank p 0.6). In stage II-III cases disease-free survival was not influenced by TFAP2E hypermethylation status in 5-FU treated (HR 0.91; 95% CI 0.52-1.59; log rank p 0.9) as well as in non-treated patients (HR 0.88; 95% CI 0.5-1.54; log rank p 0.7).

Conclusion: *TFAP2E* hypermethylation does not correlate with loss of its protein expression. Our large, systematic and comprehensive study indicates that *TFAP2E*

methylation and expression may not play a major role in predicting response to 5FU-based chemotherapy in CRC patients.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Sección 3:

TRABAJOS NO PUBLICADOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Effect of methylation in colonic polyps on the risk of developing advanced lesions at follow-up

AUTHORS: Oscar Murcia (1,2), Miriam Juárez (2), Mar Giner-Calabuig (2,3), Miren Alustiza (2), Alejandro Martínez-Roca (2), Cristina Mira (1), Carolina Mangas-Sanjuán (1), Juan A. Casellas (1), Francisco A. Ruiz-Gómez (1), Cecilia Egoavil (2), Cristina Alenda (3), Rodrigo Jover (1).

1. Servicio de Medicina Digestiva, Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria ISABIAL, Alicante, Spain.

2. Unidad de Investigación, Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria ISABIAL, Alicante, Spain.

3. Section of Digestive Diseases, Yale University, New Haven, Connecticut, USA.

4. Department of Pathology, Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria ISABIAL, Alicante, Spain.

CORRESPONDING AUTHOR: Dr. Rodrigo Jover. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital General Universitario de Alicante. C/Pintor Baeza 12. 03010 Alicante. Spain. Phone & Fax Number +34-965933468. E-mail: rodrigojover@gmail.com

Short title: methylation of polyps and risk on advanced colonic lesions

Word count: 4684 words, excluding title page, abstract, references and figures.

Type of article: research article.

Key words: methylation, advanced metachronous lesions, polyps, CIMP

Grant support: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI11/2630, INT-12-078, INT13-196, PI14/01386), FISABIO-ISABIAL foundation (UGP-13-221, UGP-14-265), and the Asociación Española contra el Cáncer (Fundación Científica GCB13131592CAST). Oscar Murcia received a Río Hortega grant from Instituto de Salud Carlos III (CM18/00058). Alejandro Martínez received a pre-doctoral grant from Instituto de Salud Carlos III (FI18/00301). Mar Giner-Calabuig received a grant from VALi+d. EXP ACIF/2016/002. Miren Alustiza received a predoctoral grant from ISABIAL (UGP-16-138). Other financial support was obtained from Asociación Española de Gastroenterología Grants (Gonzalo Miño 2014, Tamarite 2015, Grupo de endoscopia 2016). AIGPA, a private association that promotes research in gastrointestinal diseases in Alicante, also supported logistic aspects of the study. This association declares no conflict of interest.

Disclosures: No disclosures to declare from any of the authors

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

Study concept and design: Oscar Murcia, Miriam Juárez, and Rodrigo Jover

Acquisition of data: Oscar Murcia, Miriam Juárez, Mar Giner-Calabuig, Miren Alustiza, Alejandro Martínez-Roca, Cristina Mira, Cecilia Egoavil, Cristina Alenda, Carolina Mangas and Rodrigo Jover

Statistical analysis and interpretation: Oscar Murcia and Rodrigo Jover

Drafting of the manuscript: Oscar Murcia and Rodrigo Jover

Critical revision: Oscar Murcia, Miriam Juárez, Mar Giner-Calabuig, Miren Alustiza, Cecilia Egoavil, Cristina Alenda, Carolina Mangas, Juan A. Casellas, Francisco A. Ruiz-Gómez and Rodrigo Jover

Obtained funding and study supervision: Rodrigo Jover

Writing assistance: Writing assistance has been provided by SF Edit, which was supported by AIGPA.

Number of text pages: 17

Number of figures: 3

Number of tables: 5



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ABSTRACT

Introduction and aim: Endoscopic surveillance after polypectomy is mainly based on size and number of polyps found at baseline. The role of methylator phenotype (CIMP) for predicting advanced metachronous lesions (AML) in the surveillance remains poorly investigated. The aim is to study the relation between CIMP in polyps at baseline exploration and both, the risk and the time until developing AMLs.

Methods: It was designed a retrospective cohort study involving 281 patients with colonic polyps who were consecutively enrolled between 2007 and 2009, and followed-up until 2014. 595 polyps were removed in the baseline colonoscopy and analysed for pathological characteristics and CIMP using MS-MLPA technique. Patients were divided according to the presence of CIMP+ polyps (236 patients) and no CIMP+ polyps (45 patients). AML was defined by a size higher than 9mm, high grade dysplasia or villous component for adenomas and size higher than 9mm with any grade of dysplasia or proximal location for serrated lesions. Risk of AML due to CIMP marker was studied using Chi-square test and logistic regression for univariate and multivariate analysis, respectively. Log-rank test and Cox-regression model were also performed.

Results: The risk of AML was higher in patients with CIMP+ polyps (OR 4.50; 95% confidence interval (CI) 1.78-11.4; $p=0.002$). Similar results were obtained after dividing into patients with adenomas ($p=0.012$) and serrated polyps ($p=0.017$). Shorter intervals for developing AML were also found in patients with CIMP+ polyps (OR 2.4; 95% CI 1.3-4.3; $p=0.004$). Shorter intervals were also found after dividing into adenomas ($p=0.002$) and serrated lesions ($p=0.023$).

Conclusions: Patients with CIMP+ polyps associate higher risk for AMLs and shorter intervals to develop them, emerging CIMP as a useful marker for endoscopic surveillance.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

INTRODUCTION

Colorectal cancer is a major cause of cancer morbidity and death in developed countries. Endoscopic removal of precursor lesions of CRC, adenomas or serrated polyps, reduces colorectal cancer incidence and mortality. Patients with adenomas or serrated polyps removed at colonoscopy are at increased risk of developing metachronous lesions later and eventually colorectal cancer in life, and surveillance colonoscopy is recommended for patients with advanced features at baseline.

Guidelines for surveillance after polyp excision stratify patients into risk groups based mainly in some characteristics of lesions found at the index colonoscopy. According to these guidelines, the risk of advanced neoplasia at follow-up colonoscopy depends on the number, size, and histology of baseline polyps. However, it is possible that other characteristics of polyps could also be related to the risk of developing advanced lesions at follow-up, and also be of help for adequately classifying patients as high-risk patients. Until now, research aimed to investigate the role of molecular markers in the risk of developing metachronous neoplasia at follow-up has not been very extensive. Some previous studies have showed that somatic mutation in *KRAS* could be a predictor of advanced metachronous lesions (AML) in colonoscopic surveillance.¹ In addition, some papers about the consensus molecular subtypes (CMS) of CRC applied to polyps suggest the influence of certain genetic anomalies as risk markers for future CRCs.^{2,3}

In the last years, the presence of high level of methylation on CpG islands (CIMP) of certain DNA regions is gaining importance in CRC oncogenesis.⁴ Its role as a prognostic marker remains controversial by analysing it in an isolated manner, obtaining clearer

results in combination with other markers.^{5,6} It has also been described a poor response to chemotherapy in patients with CIMP-CRCs.⁷ However, the role that aberrant methylation in polyps plays on the risk of AML remains non investigated. Following this research line, the aim of our study is to evaluate whether the presence of CIMP+ polyps, in adenomatous and serrated lesions, at baseline colonoscopy could predict the risk of AML along the surveillance.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

MATERIAL AND METHODS

Design and study population:

A total of 281 patients were enrolled at the Hospital General Universitario of Alicante, Spain in a single-centre retrospective-cohort study. We retrospectively recruited patients diagnosed with polyps in a colonoscopic examination between the years 2007 and 2009 at the Hospital General Universitario of Alicante. All included patients had at least one surveillance colonoscopy performed more than 6 months after the baseline examination. Data on surveillance colonoscopies were collected until December 2014. Colonoscopy was performed either on the basis of symptoms or as a follow up surveillance after a CRC or adenoma excision. Clinicopathological information and patient personal history were also collected. Patients were excluded when they were diagnosed of CRC at the inclusion in the study or they were previously diagnosed with polyposis syndrome, Lynch syndrome, or inflammatory bowel disease. This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital General Universitario of Alicante, and all clinical data of patients was anonymized.

Samples

595 polyps were endoscopically removed in the baseline colonoscopy and kept for genetic and histological analysis. Samples from paraffin-embedded tissue of each polyps were obtained by microdissection in ten, 5- μ mthick sections. Sample DNA was extracted with the QIAamp DNA Investigator kit (QIAGEN, Hilden Germany) and with the E.Z.N.A Forensic DNA kit (OMEGA Bio-tek, USA), according to manufacturer's protocols.

For each polyp, data about its genetic profile and histopathological aspects like size, number, morphology, pathology and location was collected. It was considered as

proximal location those polyps at cecum, right or transverse colon; and distal location those ones placed at rectum, sigmoid or left colon including splenic flexure.

The advanced adenomatous lesions included those with a size ≥ 10 mm, high grade of dysplasia or villous component. On the other side, advanced serrated lesions were defined by a size ≥ 10 mm, proximal location with any size or lesions with any grade of dysplasia.

DNA extraction

Paraffin-embedded (FFPE) samples were used in this study. FFPE samples from the different participant centres were sent to the Hospital General Universitario of Alicante. There, DNA was extracted from paraffin-embedded tissue with the QIAamp DNA Investigator kit (QIAGEN, Hilden Germany) and with the E.Z.N.A Forensic DNA kit (OMEGA Bio-tek, USA), according to manufacturer's protocols.

CIMP analysis

For assessing the level of aberrant methylation, genomic DNA was modified with sodium-bisulphite using the EZ Methylation Gold Kit (Zymo Research, Orange, CA). The PCR reaction contained bisulphite modified DNA, HotStar Taq polymerase, forward primers, biotinylated reverse primers, and water. We analysed eight markers (*CACNA1G*, *CDKN2A (p16)*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* and *SOCS1*) by MS-MLPA technology, considering as CIMP- those polyps with five or less aberrant methylated markers (CIMP-low). The presence of six to eight methylated markers was

considered as CIMP+ (CIMP-High).⁸ Patients were considered as CIMP+ if at least one of their polyps was CIMP+.

Other genetic analysis

In order to assess the risk that CIMP status in polyps could add for the development of AML, BRAF and KRAS genes were studied to adjust analysis as potential confounder factors. *BRAF* mutations at codon 600 (V600E) were identified with real time PCR (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), based on the allelic discrimination method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Specific TaqMan probes, as previously described by Benlloch et al were used.⁹ *KRAS* mutations at exon 2, which included codons 12 and 13, were identified with DNA Sanger sequencing (ABI3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), as previously described.¹⁰ The same than with CIMP, patients were considered as BRAF or KRAS positive if at least one of their polyps showed BRAF or KRAS mutation respectively.

Statistical analysis

All the data was analysed using SPSS 25.0 software. Descriptive and comparative analysis were performed. For the first one, parametric continuous variables were reported as mean \pm standard deviation (SD) and non-parametric continuous variables as median and interquartile range (IQR). Categorical variables were expressed with absolute frequencies and percentages.

For comparative analysis, patients were classified according to the presence of CIMP+ polyps or not at baseline colonoscopy. Additional analysis compared adenomas and

serrated lesions. Patients with both type of lesions were excluded for these comparative analyses. Both groups were compared by sex, presence of genetic alterations in the polyps, previous CRC, previous smoking and other baseline categorical features with chi-square test. Age, size and number of polyps at baseline colonoscopy and other quantitative variables were compared with Student t-test after applying Levene's test for parametric variables, and U-Mann Whitney test was used for those non-parametric variables. In the same way, polyps from the baseline colonoscopy were also compared for several variables according to the presence of CIMP+ status or not.

For both groups of patients, it was analysed the risk of AML according to the presence of CIMP+ status with a univariate logistic regression. Other variables as age, sex, previous smoking and history of CRC, mutations in KRAS and BRAF and classical factors for AML (more than 3 polyps, villous component and size of lesions) were also analysed and taken into account for multivariate analysis if $p < 0.20$ (ref). For multivariate analysis, a binary-logistic regression model was performed, showing results as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI).

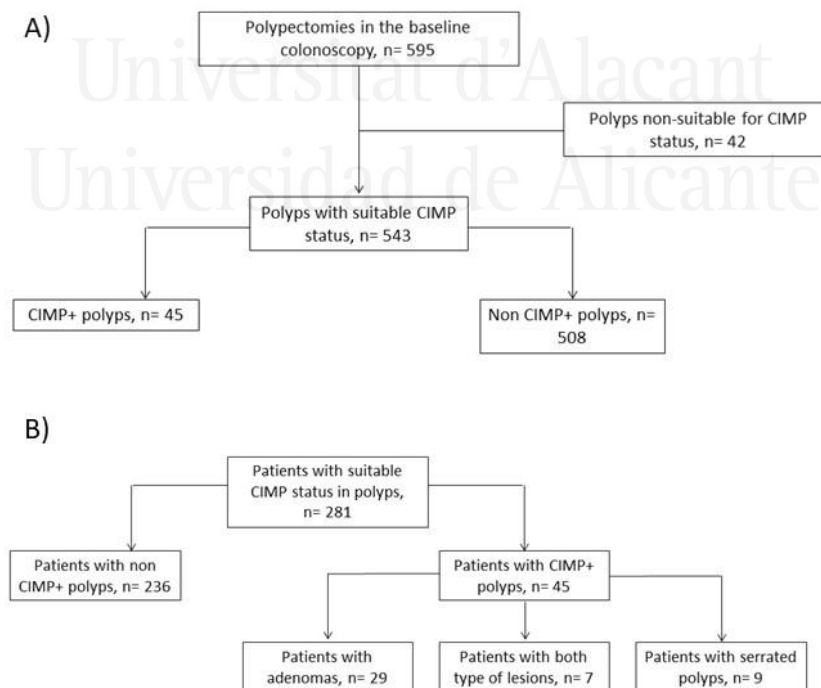
The analysis of time for developing AML according to the presence of aberrant methylation in polyps was performed with a log-rank test and also Cox-regression for univariate analysis, also graphically shown as Kaplan Meier survival curves. Again, for multivariate analysis it was carried out a Cox-regression model adjusting by variables with $p < 0.20$, as previously mentioned. Results are shown as median of time (months) and 95% CI. All P-values were two-sided, with $P < 0.05$ considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics of study population

Among the 281 patients, 177 were men (63.0%) and the median age at recruitment was 65 (range 28-90), being 12.8% of patients at less sporadic smokers at sometimes previously. 72 patients (25.6%) were previously diagnosed of polyps and 41 patients (14.6%) had suffered a previous CRC. The median of follow-up period was 36 months (IQR: 25-48), with a median of colonoscopies along the surveillance of 2 (range: 1-6). Figure 1 shows the flow chart of patients and also of polyps removed in the baseline colonoscopy regarding CIMP status.

Figure 1. Flow charts of the study. A) Flow chart of polyps removed in the baseline colonoscopy. B) Flow chart of the study population.



Characteristics of polyps of the baseline colonoscopy according to CIMP status:

It was analysed CIMP status in 595 polyps removed from the baseline colonoscopy, and categorized as CIMP+ or CIMP- polyps. 42 polyps were excluded due to non-valuable results. Comparisons of anatomopathological and clinical features between both groups are shown in Table 1.

Table 1. Characteristics of polyps of the baseline colonoscopy according to CIMP status. Unclassifiable polyps were defined after examination by two expert pathologists.

Variable	CIMP- polyps, n=508	CIMP+ polyps, n=45	P value
Adenomatous lesions, n (%)	374 (73.6)	32 (71.1)	0.189
<i>Tubular adenomas, n (%)</i>	324 (63.8)	24 (53.3)	
<i>Villous adenomas, n (%)</i>	2 (0.4)	0 (0)	
<i>Tubulovillous adenomas, n (%)</i>	46 (9.1)	8 (17.8)	
<i>Aberrant crypt foci, n (%)</i>	2 (0.4)	0 (0)	
Serrated lesions, n (%)	133 (26.2)	13 (28.9)	0.634
<i>Hyperplastic lesions, n (%)</i>	106 (20.9)	10 (22.2)	
<i>Sessile serrated lesions, n (%)</i>	16 (3.1)	2 (4.4)	
<i>Traditional serrated lesions, n (%)</i>	8 (1.6)	0 (0)	
<i>Mixed serrated lesions, n (%)</i>	3 (0.6)	1 (2.2)	
Unclassifiable lesions, n (%)	1 (0.2)	0 (0)	--
Villous component, n (%)	51 (10.0)	8 (17.9)	0.125
Right location, n (%)	160 (31.5)	8 (17.9)	0.078
Size, n (%)	--	--	0.106
< 5 mm, n (%)	70 (13.8)	1 (2.6)	

5-9mm, n (%)	218 (42.9)	19 (42.1)	
>9mm, n (%)	220 (43.4)	24 (55.3)	
High grade of dysplasia, n (%)	30 (5.9)	5 (11.1)	0.276
Advanced adenomatous lesions, n (%)	253 (49.8)	26 (57.8)	0.364
Advanced serrated lesions, n (%)	135 (26.6)	14 (31.1)	0.799

Characteristics of patients according to CIMP status

Some characteristics of patients were analysed after dividing them according to have at less one CIMP+ polyp or no CIMP+ polyps. A higher number of colonoscopies and polypectomies were carried out in patients with CIMP+ polyps, also presenting more AML along their follow-up (Table 2).

Table 2. Characteristics of patients according to CIMP status of polyps at the baseline colonoscopy. Patients are classified as CIMP+ polyps if they have at less one polyp with CIMP+ status, independently of the genetic profile of the other ones. SD: standard deviation. CRC: colorectal cancer. AML: advanced metachronous lesions.

Variables	Total of patients (n=281)	Patients with CIMP+ polyps (n=45)	Patients with no CIMP+ polyps (n=236)	P value
Age, mean (SD)	65.2 (11.9)	65.3 (11.9)	65.2 (11.9)	0.976
Sex, men (%)	177 (63.0)	27 (60.0)	150 (63.6)	0.650
Number of polyps, mean (SD)	2.9 (2.6)	3.9 (3.6)	2.7 (2.4)	0.004
Surveillance colonoscopies, mean (SD)	1.9 (1.1)	2.4 (1.4)	1.8 (1.0)	0.007
Previous smokers, n (%)	36 (12.8)	5 (11.1)	31 (13.1)	0.713

Previous CRC, n (%)	41 (14.6)	10 (22.2)	31 (13.1)	0.114
BRAF-mut polyps, n (%)	44 (15.7)	11 (24.4)	33 (14.0)	0.207
KRAS-mut polyps, n (%)	72 (25.6)	16 (35.6)	56 (23.7)	0.248
Polyp \geq 10 mm, n (%)	151 (53.7)	27 (60.0)	124 (52.8)	0.372
Presence of villous component, n (%)	24 (8.5)	7 (15.6)	17 (7.2)	0.066
AML, n (%)	86 (30.6)	26 (57.8)	60 (25.4)	<0.001

Risk of AML according to CIMP status in polyps at the baseline colonoscopy

We examined the risk of developing AML according to the CIMP status of polyps in the baseline examination. In addition, in order to assess which factors are also related to AML in our study, we performed several univariate logistic regressions that encompasses some characteristics of patients and their polyps removed in the baseline colonoscopy. The first analysis took into account all the patients with no pathological distinction of their polyps (Table 3A), whereas the second one split them in two groups: those patients with excision of adenomas and those ones with excision of serrated lesions. In the univariate analysis, CIMP+ status associated a higher risk ($p < 0.001$) for AML. For multivariate analysis, adjustment considered variables with $p < 0.20$, as previously mentioned. The logistic regression showed CIMP+ as the only genetic biomarker with predictive power for AML, with no significant results concerning other biomarkers (KRAS, $p = 0.063$). Similar results are obtained with the division of patients according to histopathological nature of polyps (Table 3B): CIMP+ associates' higher risk of AML as in serrated lesions ($p = 0.017$) as well as in adenomas ($p = 0.012$).

Table 3. Risk factors for AML. A) Univariate and multivariate analysis of risk of AML according to findings in the baseline colonoscopy, independently of their histological type. B) Risk for AML in patients with CIMP+ polyps after split them into adenomatous and serrated lesions. Patients with both adenomatous and serrated polyps are excluded in this analysis. *OR: odds ratio. CI: confidence interval. AML: advanced metachronous lesions. SD: standard deviation. CRC: colorectal cancer.*

A)

Variable	Advanced metachronous lesion					
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Yes, n= 86 (30.6%)	No, n= 195 (69.4%)	P value	OR	95 % CI	P value
Age, mean (SD)	65.8 (11.5)	65.0 (12.0)	0.640			
Sex, men (%)	58 (67.4)	119 (61.0)	0.305			
Previous smokers, n (%)	60 (21.4)	23 (8.2)	0.020	2.81	0.94-8.37	0.064
Previous CRC, n (%)	18 (20.9)	23 (11.8)	0.048	1.48	0.55-3.99	0.435
BRAF-mut polyps, n (%)	14 (16.1)	39 (18.4)	0.636			
KRAS-mut polyps, n (%)	33 (37.9)	44 (20.8)	0.002	2.22	0.96-5.15	0.063
CIMP+ polyps, n (%)	26 (30.2)	19 (9.7)	<0.001	4.50	1.78-11.4	0.002
Polyp ≥10 mm, n (%)	48 (55.8)	103 (53.1)	0.674			
≥ 3 polyps, n (%)	47 (54.7)	66 (33.8)	0.001	1.87	0.87-4.04	0.112
Proximal serrated polyps, n (%)	2 (2.3)	3 (1.5)	0.648			
Villous component, n (%)	8 (9.3)	16 (8.2)	0.762			

B)

	Patients with adenomatous polyps					Patients with serrated polyps				
	Univariate analysis			Multivariate analysis		Univariate analysis			Multivariate analysis	
	AML (n, %)	No AML (n, %)	P value	OR (95% CI)	P value	AML (n, %)	No AML (n, %)	P value	OR (95% CI)	P value
CIMP+	15 (51.7)	14 (48.3)	0.001	4.10 (1.37-	0.012	6 (66.7)	3 (33.3)	0.001	8.60 (1.48-	0.017
CIMP-	43 (26.7)	118 (70.3)		12.2)		7 (20.6)	27 (79.4)		49.9)	

Time until developing AML according to CIMP status in polyps at the baseline

colonoscopy

It was evaluated whether different genetic profile of polyps at baseline colonoscopy could imply different velocities for developing AML in subsequent colonoscopies with no distinction among pathological nature of polyps (Table 4-A). We elaborated some univariate Cox-regressions for the study of potential confounder factors, including them later if they showed $p < 0.20$. In the univariate analysis, CIMP+ status had significant results ($p < 0.001$). In the multivariate, CIMP+ appears once again as the only genetic biomarker that could predict a shorter interval for developing AML (KRAS, $p = 0.175$) (Figure 2). After dividing the study population according to the histopathological nature of polyps, shorter intervals were found as in patients with CIMP+ adenomas ($p = 0.002$) as in those with CIMP+ serrated polyps ($p = 0.023$) (Table 4-B). In addition, the presence of more than 3 polyps also associated higher risk but only in patients with adenomas ($p = 0.046$).

Table 4. Time until developing AML according to potential risk factors. Univariate and multivariate analysis of time until developing AML according to findings in the baseline colonoscopy. Some findings include classical risk factors and basal characteristics of patients. B) Time until developing AML in patients with CIMP+ polyps after split them into adenomatous and serrated lesions. Patients with both adenomatous and serrated polyps are excluded in this analysis. *OR: odds ratio. CI: confidence interval. AML: advanced metachronous lesions. SD: standard deviation. CRC: colorectal cancer.*

		Time until developing AML				
		Univariate analysis		Multivariate analysis		
Variable		Time in months, mean (SD)	P value	OR	95% CI	P value
Sex	Men	45.2 (2.3)	0.072	1.99	1.04-3.78	0.037
	Women	49.3 (2.4)				
Previous smokers	Yes	27.8 (4.3)	0.001	1.72	0.84-3.52	0.142
	No	45.1 (2.2)				
Previous CRC	Yes	44.5 (4.1)	0.435			
	No	44.2 (1.4)				
BRAF-mut polyps	Yes	41.4 (4.1)	0.351			
	No	47.7 (1.8)				
KRAS-mut polyps, n (%)	Yes	42.9 (3.0)	0.058	1.52	0.83-2.78	0.175
	No	48.9 (2.0)				
CIMP+ polyps, n (%)	Yes	33.8 (2.7)	<0.001	2.40	1.33-4.34	0.004
	No	50.1 (1.9)				
Polyp ≥10 mm, n (%)	Yes	46.6 (2.3)	0.841			
	No	44.8 (2.0)				
≥ 3 polyps, n (%)	Yes	40.4 (2.8)	<0.001	1.83	0.98-3.43	0.059

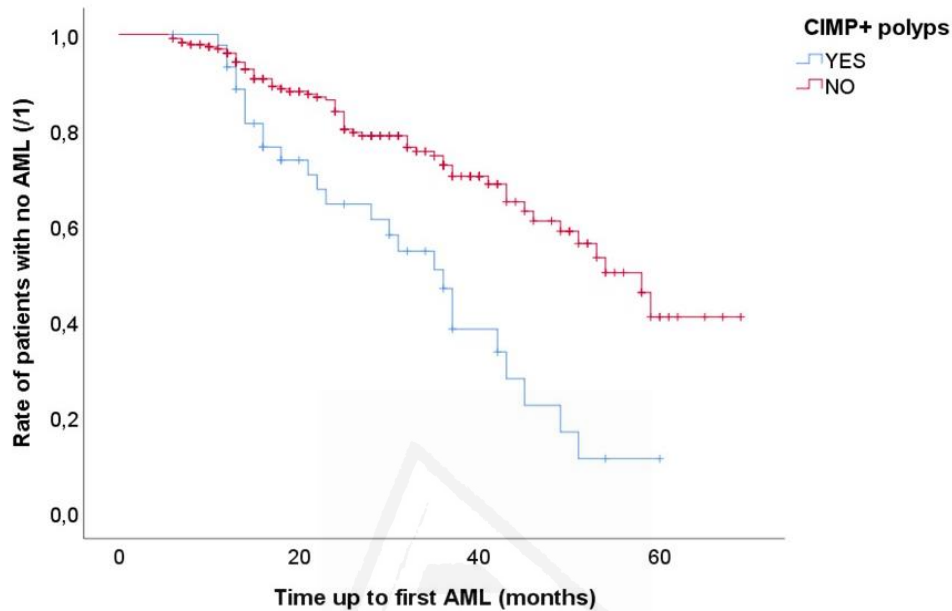
	No	50.8 (2.0)	
Proximal serrated polyps, n (%)	Yes	46.2 (2.6)	0.310
	No	46.5 (2.1)	
Villous component, n (%)	Yes	39.6 (5.1)	0.357
	No	47.3 (1.8)	

B)

		Patients with adenomatous polyps				Patients with serrated polyps				
		Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis		
		Time, months (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	Time, months (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	
CIMP+	n=29	34 (28.3-38.9)	<0.001	2.92 (1.48-5.75)	0.002	n=9	31 (21.5-39.7)	0.001	2.75 (1.15-6.62)	0.023
CIMP-	n=161	49 (45.0-53.3)				n=34	51 (44.7-57.6)			

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Figure 2. Time until developing an AML according to CIMP status of polyps at the baseline procedure. Kaplan Meier survival curves illustrates higher proportion of AML in patients with CIMP+ polyps. AML: advanced metachronous lesions.



Usefulness of assessment CIMP status for colonoscopic surveillance

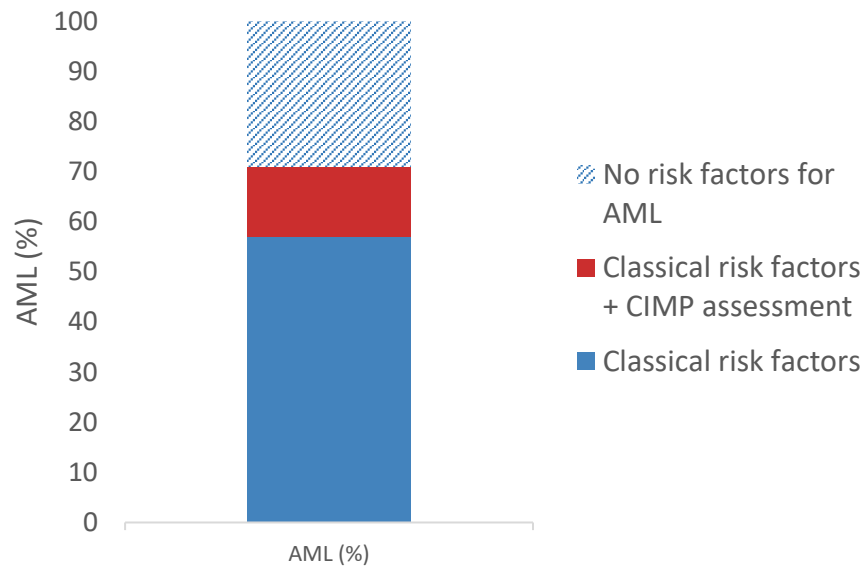
We determined the number of patients with classical risk factors for AML at baseline colonoscopy. It was compared the number of patients who developed an AML along the surveillance whether they obeyed a classical risk factor or also had CIMP+ status. 49 patients (32.0%) with a classical risk factor developed an AML vs 37 (28.9%) with no classical risk factors that also developed it ($p=0.572$). The addition of CIMP analysis to the classical risk factors changed the number of patients who benefited from this genetic tool: 58 patients (35.4%) with a classical risk factor or CIMP+ developed an AML vs 28 (23.9%) with no classical risk factors and no CIMP+ status that also developed it ($p=0.040$), highlighting the usefulness of adding this genetic analysis to determine the probability of AML along the surveillance (Table 5).

Table 5. Analysis of development AML according to presence of classical risk factors at the baseline colonoscopy itself vs the same factors plus adding CIMP analysis. AML: advanced metachronous lesions.

	Classical risk factors for AML			Classical risk factors for AML + CIMP analysis		
	Yes (%)	No (%)	P value	Yes (%)	No (%)	P value
AML	49 (32.0)	37 (28.9)	0.572	58 (35.4)	28 (23.9)	0.040
	104 (68.0)	91 (71.1)		106 (64.6)	89 (76.1)	

By comparing the 86 patients with an AML along the surveillance, 57% obeyed a classical risk factor for its development. The addition of CIMP analysis increased the percentage up to 71% (Figure 3). With this increase, the NNT for finding a patient with CIMP+ polyps who develop an AML along the surveillance was 8.

Figure 3. Usefulness of CIMP analysis in polyps of the baseline colonoscopy for assessing the risk of AML. The addition of CIMP assessment could increase the power of prediction of AML above 70%. AML: advanced metachronous lesions.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

DISCUSSION

Our results suggest that the CIMP status of polyps at the baseline colonoscopy could add some valuable information regarding the risk of AML along the colonoscopic surveillance. Having at least one CIMP+ polyp, independently predicts a higher risk of developing AML and this development occurs faster in these patients. This predictive value is independent of size and other classic factors related with the development of AML and is maintained for both adenomatous and serrated polyps. These results established the potential utility of molecular markers for stratifying risk among patients with colonic polyps. The addition of genetic markers as another tool for assessing the risk of AML could improve the stratification of risk in these patients at surveillance.

Previous studies from our group have investigated the role of molecular markers in polyps in the prediction of development of metachronous lesions, especially advanced adenomas, showing an increased risk of AML in patients with KRAS-mutated polyps at baseline. In this study we found that CIMP status is able to predict the development of AML also independently of KRAS. The role of molecular markers in the prediction of risk for AML is plausible, because of these markers can identify polyps with features related to the main causes of development of metachronous neoplasia: missed or incompletely resected lesions in low-quality baseline procedures or fast-growing biological characteristics of the lesions, which might promote rapid growth and progression to advanced states. Both of these conditions could be potentially related to CIMP+ lesions. On the one hand, CIMP+ lesions have been related to the serrated pathway of carcinogenesis, with lesions more frequently located in the right colon and more frequently difficult to detect and resect, factors strongly linked to quality of

colonoscopy. On the other hand, CIMP lesions have also been related to fast oncogenic growth.

Contrary to commonly thought, we found a similar proportion of CIMP- and CIMP+ adenomas and in serrated lesions suggesting that CIMP+ status is not limited to last ones. Other previous studies report that adenomas show classically a low or even no level of methylation. However, some recent articles show proportions of CIMP+ adenomas up to 30% of samples.¹¹ In our study, the proportion adenomas with high level of methylation is much fewer, about 8%, but patients with these adenomas show a higher risk of AML in the univariate analysis (51.7% CIMP+ adenomas vs 26.7% CIMP- adenomas; $p=0.001$). Moreover, in the multivariate this finding does not limit to adenomas ($p=0.012$), but also involve serrated polyps as expected ($p=0.017$). This fact could have several explanations. The first one, the fact that the analysis of CRC often takes into account a single sample of the tumor, omitting the intratumor heterogeneity already described that could albeit portions of methylated cells. In this case, CRCs following adenomas would albeit clones with CIMP+ not detected. Another possible explanation is based on the continuous variability of genetic alterations among precursor colorectal lesions. It could suggest that, instead of dividing the precursor lesions as hermetic compartments, linking adenomas or serrated lesions to a particular molecular alteration, we should think in several variable overlapping markers that could appear to a greater or lesser extent in any precursor lesion, as adenomas as serrated lesions. In any case, this finding deserves further examination in next studies.

Patients with CIMP+ polyps also show shorter intervals for the development of AML compared to patients with CIMP- polyps. It might be due to a higher velocity of the implied oncogenic via. But, as opposed to patients with mutant-BRAF polyps, this accelerated oncogenesis in CIMP+ polyps do not translate into a worst prognosis of the consequent CRC compared to other tumors with slower oncogenesis and no CIMP+ precursor lesion, as some studies suggest.¹² Maybe the prognosis of CRC is further associated to factors that contribute to dissemination and matrix remodelling than the own process and velocity of tumor development, as CMS 4 referred.¹³

We examined in our retrospective cohort other aspects as size, villous component are intrinsic features of polyps that have been postulated as risk factors in observational studies, observing no association between either size ($p=0.674$) nor villous component ($p=0.762$) and proximal location in serrated lesions ($p=0.648$). Only the presence of 3 or more polyps implied higher proportions of AML ($p=0.001$) in the univariate analysis. However, CIMP remains as a marker of risk of AML and shorter intervals for their development, as in adenomas ($p=0.002$) as in serrated polyps ($p=0.023$), independently these pathological features. It could be explained by, at least initially in the first steps of carcinogenesis, there's no overlapping between these characteristics of the polyps removed and their underlying CIMP+ status.

Another important point of discussion concerns the usefulness of this genetic analysis. Seen the above shown results, CIMP seems to add useful information that could modify the endoscopic surveillance. In our retrospective cohort study, only 57% of patients who develop an AML satisfied at less one classical risk factor, surpassing the 70% adding CIMP

analysis. In absolute cyphers, it's necessary to investigate the CIMP status in 8 patients in order to prevent the development of an AML. Cost-effectiveness studies regarding this issue should be addressed.

Our results are in the same line than other recent studies. Chang et al. refer in their study that polyps of CMS 1 and 2 are the most prevalent at premalignancy stage. Concretely, CMS 1 subtype harbours hypermethylated CRCs, taking into account features like this when this classification is applied to polyps. Thus, it seems that CIMP+ lesions are at high risk of becoming a CRC if they are not removed. Our results suggest this fact, linking CIMP+ status with higher risk of AML. Although both conclusions are not the same, as Chang study as ours indicate that CIMP pattern is a marker of risk, as of premalignant lesion as of risk for develop it in the future. Conversely, a similar study by Komor et al establishes a higher risk of progressing to CRC those polyps of CMS 2. Our results do not correlate with this observation, since CMS 2 exhibits low or non-CIMP pattern and high somatic copy number alterations.

Our study has some limitations. First of all, it's a retrospective observational study, with the inherent typical biases. One of them is the lack of association of some classical factors for AML. Another one is the limited data collection. We could not evaluate several intrinsic features of patients as body index mass and grade of smoking, being able to know only whether the patient was a previous smoker at any time or not. In addition, bowel cleansing information was not assessed for this study. This could have a variable impact in the validity of our results, since a poor bowel preparation could prevent the diagnosis and removal of further polyps as in the basal exploration as in the subsequent ones. Although it is unlikely that this fact changes the proportion of lesions

greater than 1 cm, it could do it for serrated proximal lesions or even flat lesions at any location. Despite this limitation, our results are coherent and expected, similar to other previously discussed and probably not affecting the external validity. The small sample size in some subgroups, particularly in patients with serrated lesions or CIMP+ polyps, has not prevented us to extract conclusions regarding CIMP status, avoiding p values not reaching the statistical significance due to small sample size.

In summary, our results suggest that analysis of CIMP status could be a useful and profitable marker for assessing the risk of AML. A higher risk and shorter intervals for develop AML are shown when they exhibit CIMP+ pattern, as in adenomas as in serrated polyps. Moreover, as far as our knowledge, this is the first study that investigates the predictive power of CIMP status for assessing the risk of AML. However, several aspects as bowel cleansing are lacking here. Therefore, further prospective cohort studies, with a greater sample size, are necessary to confirm and validate our findings. If it does, the study of the genetic profile of polyps could add very useful information and, lastly, change the optimal regimen of endoscopic surveillance.

REFERENCES

1. Juárez M, Egoavil C, Rodríguez-Soler M, et al. KRAS and BRAF somatic mutations in colonic polyps and the risk of metachronous neoplasia. *PLoS One*. 2017;12(9). doi:10.1371/journal.pone.0184937
2. Chang K, Willis JA, Reumers J, et al. Colorectal premalignancy is associated with consensus molecular subtypes 1 and 2. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018. doi:10.1093/annonc/mdy337
3. Komor MA, Bosch LJW, Bounova G, et al. Consensus molecular subtype classification of colorectal adenomas. *J Pathol*. 2018. doi:10.1002/path.5129
4. Murcia O, Juárez M, Hernández-Illán E, et al. Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. *World J Gastroenterol*. 2016;22(13). doi:10.3748/wjg.v22.i13.3516
5. Juo YY, Johnston FM, Zhang DY, et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2014. doi:10.1093/annonc/mdu149
6. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009. doi:10.1136/gut.2008.155473
7. Jover R, Nguyen T, Prezcarbonell L, et al. 5-fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2011. doi:10.1053/j.gastro.2010.12.035
8. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator

- phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006. doi:10.1038/ng1834
9. Benlloch S, Payá A, Alenda C, et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: Comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagnostics.* 2006. doi:10.2353/jmoldx.2006.060070
 10. Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M, et al. Clinical subtypes and molecular characteristics of serrated polyposis syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013. doi:10.1016/j.cgh.2012.12.045
 11. van Lanschot MCJ, Carvalho B, Rausch C, et al. Molecular profiling of longitudinally observed small colorectal polyps: A cohort study. *EBioMedicine.* 2019. doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.009
 12. 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.* 2017. doi:10.1038/nrc.2016.126
 13. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015. doi:10.1038/nm.3967

*SECCIÓ*N 4: *Conclusiones*



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. La creciente comprensión de la biología del CCR conduce a la búsqueda continua de biomarcadores que puedan tener un papel pronóstico y predictivo de respuesta a la QT, en busca de una medicina personalizada.
2. De entre todas las características genético-moleculares del CCR, interesan aquellas que intervienen en la progresión tumoral. Algunas de las más relevantes incluyen mutaciones en BRAF y KRAS, metilación de ciertos genes e inestabilidad de microsatélites.
3. La estratificación tumoral en 5 subtipos de acuerdo a combinaciones a estos 4 niveles permite obtener diferencias pronósticas en términos de supervivencia libre de enfermedad, donde los tumores inestables en los microsatélites presentan el mejor pronóstico y aquellos estables con mutación en BRAF y fenotipo metilador el peor.
4. Según los resultados expuestos, el subtipo 4 es el que presenta una respuesta más clara a la QT, seguido del subtipo 3. Aunque existe una tendencia a la mejoría en el subtipo 2, el escaso tamaño muestral de este subgrupo impide obtener conclusiones sólidas a este respecto.
5. Según algunos estudios propuestos, la metilación del gen TFAP2E podría tener un papel predictivo de ausencia de respuesta al tratamiento con 5-FU, pudiendo optimizar esta estrategia terapéutica.
6. La validación realizada obtiene unos resultados opuestos mayoritariamente, en los que la hipermetilación de dicho gen carece de poder predictivo. Tampoco existe correlación entre la hipermetilación de TFAP2E y su expresión proteica.
7. El conocimiento cada vez mayor del comportamiento biológico del CCR permitirá la búsqueda de nuevos biomarcadores y perfeccionamiento de las estrategias de prevención y manejo actuales.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Anexo 1

Material suplementario del artículo 1

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of patients according to subtype in complete-cases model. St, subtype. DFS, disease-free survival.

		St 1 (n=20 [2.8%])	St 2 (n= 16 [2.2%])	St 3 (n= 188 [26.1%])	St 4 (n= 315 [43.7%])	St 5 (n= 18 [2.5%])	Unclassified (n= 164 [22.7%])
Median of age (years)		76	75	73	72	65	72
Age at diagnosis (years, %)	<40	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	2 (0.6)	0 (0)	2 (1.2)
	40-49	0 (0)	1 (6.3)	12 (6.4)	5 (1.6)	3 (16.6)	4 (2.4)
	50-59	2 (10.0)	2 (12.5)	16 (8.5)	31 (9.8)	3 (16.6)	10 (6.1)
	60-69	7 (35.0)	3 (18.8)	32 (17.0)	74 (23.5)	6 (33.3)	33 (20.1)
	>70	11 (55.0)	10 (62.5)	127 (67.6)	203 (64.4)	9 (50.0)	115 (70.1)
Sex, n (%)	Male	10 (50.0)	9 (56.3)	121 (64.4)	199 (63.2)	7 (38.9)	89 (54.3)
	Female	10 (50.0)	7 (43.8)	67 (35.6)	116 (36.8)	11 (61.1)	75 (45.7)
TNM stage at diagnosis	I	2 (10.0)	1 (6.3)	40 (21.3)	43 (13.7)	4 (22.2)	27 (16.5)
	II	12 (60.0)	3 (18.8)	57 (30.3)	128 (40.6)	10 (55.6)	61 (37.2)
	III	5 (25.0)	6 (37.5)	56 (29.8)	106 (33.7)	1 (5.6)	55 (33.5)
	IV	1 (5.0)	6 (37.5)	35 (18.6)	38 (12.1)	3 (16.7)	21 (12.8)
Tumor location, n (%)	Right colon	18 (90.0)	10 (62.5)	61 (32.4)	57 (18.1)	10 (55.6)	78 (47.6)
	Left colon	2 (10.0)	6 (37.5)	127 (67.6)	258 (81.9)	8 (44.4)	86 (52.4)
1st line Chemotherapy	5-FU or Capecitabine	1 (5.0)	2 (12.5)	14 (7.4)	54 (17.1)	5 (27.8)	12 (7.3)
	e	3 (15.0)	2 (12.5)	28 (14.9)	70 (22.2)	2 (11.1)	36 (22.0)
	FOLFOX	16 (80.0)	12 (75.0)	146 (77.7)	191 (60.6)	11 (61.1)	116 (70.7)
	No CT						
DFST, months (median)		61.1	18.9	38.3	50.4	63.9	58.1

Supplementary Table 2. Overall prognosis for different subtypes in the complete-cases model. Subtype 4 serves as a reference. The analysis was adjusted for sex, age, chemotherapy, and TNM as potential confounder factors. CRC, colorectal cancer; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

	Case participants		Relapse or CRC-death				
	Number	%	Number	%	HR	95% CI	P value
Subtype 1	20	2.8	6	30.0	0.57	0.25-1.29	0.175
Subtype 2	16	2.2	10	66.7	1.77	0.93-3.36	0.082
Subtype 3	188	26.1	103	56.0	1.25	0.97-1.60	0.085
Subtype 4	315	43.7	156	50.3	1.0	Ref	--
Subtype 5	18	2.5	4	22.2	0.45	0.17-1.21	0.113
Unclassified	164	22.7	64	39.8	0.79	0.59-1.07	0.127

Supplementary Table 3. Clinical characteristics of patients with advanced stage II and stage III tumors in complete-cases model. DFST, disease-free survival time. St, Subtype.

		St 1 (n=7 [2.6%])	St 2 (n= 16 [2.2%])	St 3 (n= 65 [24.3%])	St 4 (n= 121 [45.3%])	St 5 (n= 3 [1.1%])	Unclassified (n= 65 [24.3%])
Median of age (years)		74	74	72	72	63	72
Age at diagnosis (years, %)	<40	0 (0)			0 (0)	0 (0)	
	40-49	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2.5)	1	1 (1.5)
	50-59	0 (0)	0 (0)	4 (6.2)	15 (12.4)	(33.3)	1 (1.5)
	60-69	3 (42.9)	1 (16.7)	7 (10.8)	26 (21.5)	0 (0)	4 (6.2)
	>70	4 (57.1)	4 (66.7)	43 (66.2)	77 (63.6)	2 (66.7)	14 (21.5)
Sex, n (%)	Male	4 (57.1)	3 (50.0)	35 (53.8)	75 (62.0)	2 (66.7)	31 (47.7)
	Female	3 (42.9)	3 (50.0)	30 (46.2)	46 (38.0)	1 (33.3)	34 (52.3)
TNM stage at diagnosis	II	2 (28.6)	0 (0)	9 (13.8)	15 (12.4)	2 (66.7)	10 (15.4)
	III	5 (71.4)	6 (100.0)	56 (86.2)	106 (87.6)	1 (33.3)	55 (84.6)
Tumor location, n (%)	Right colon	5 (71.4)	4 (66.6)	23 (35.4)	23 (19.0)	2 (66.7)	30 (46.2)
	Left colon	2 (28.6)	2 (33.3)	42 (64.6)	98 (81.0)	1 (33.3)	35 (53.8)
1st line Chemotherapy	5-FU or Capecitabine	3 (42.9)	3 (50.0)	21 (32.3)	48 (39.7)	3	21 (32.3)
	FOLFOX	1 (14.3)	1 (16.7)	19 (29.2)	40 (33.1)	(100.0)	24 (36.9)
	No CT	3 (42.9)	2 (33.3)	25 (38.4)	33 (27.3)	0 (0)	20 (30.8)
						0 (0)	
DFST, months (median)		56.8	44.5	32.7	47.5	71.9	55.6

Supplementary Table 4. Chemotherapy response of different subtypes in univariate and multivariate analyses using the complete-cases model. The multivariate analysis was adjusted for sex, age, and TNM stage for each subtype. CT, chemotherapy; DFS, disease-free survival; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

	Univariate analysis				Multivariate analysis		
	CT	Number of patients	Median of DFS time (months)	P value	HR	95% CI	P value
Subtype 1	Yes	4	26.7	0.222	1.10	0.38-3.17	0.866
	No	3	64.4				
Subtype 2	Yes	4	40.2	0.046	1.48	0.45-4.93	0.521
	No	2	0.9				
Subtype 3	Yes	40	50.8	0.006	1.84	0.75-4.50	0.182
	No	25	29.5				
Subtype 4	Yes	88	53.6	0.000	1.92	1.10-3.26	0.021
	No	33	30.0				
Subtype 5	Yes	3	--	--	--	----	--
	No	0					
Unclassified	Yes	45	57.6	0.082	1.36	0.56-3.33	0.500
	No	20	40.2				

Anexo 2

Material suplementario del artículo 2

eTable 1. Characteristics of Epicolon I patients

eTable 2. Characteristics of Clinical cohort patients

eTable 3. Primer sequences

eFigure 1. Schematic representation of TFAP2E gene.

eFigure 2. Methylation analysis of TFAP2E CpG islands in CRC tissues. Calculation of cutoff value of TFAP2E Intron 3 methylation.

eFigure 3. Correlation between TFAP2E intron 3 methylation and IHC expression.

eFigure 4. Epicolon I. Overall Survival Stage IV Patients: TFAP2E IHC Expression. Disease Free Survival Stage II and III Patients: TFAP2E IHC Expression.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Patients

This study included 532 CRC non-selected patients that were enrolled as part of the EPICOLON I project. EPICOLON I was a retrospective observational study with a total of 1222 consecutive CRC patients diagnosed in 20 Spanish hospitals between November 2000 and October 2001. These 532 out of 1222 patients were stage II-IV and had five-year follow-up data available. The study was approved by the institutional ethics committee of each participant hospital and written informed consent was obtained from all patients. Adjuvant chemotherapy was administered according to standard clinical criteria following standard schedules and doses. Mean follow-up (\pm SD) was 1212 ± 717 days or 3.4 ± 1.9 years. The clinical-based cohort included 251 patients diagnosed with CRC from the Hospital Clinic of Barcelona with follow-up data available. Mean follow-up (\pm SD) was 1642 ± 875 days or 4.5 ± 2.4 years. This set of patients included a total of 187 diagnosed at stages II and III, all of them receiving 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy, whereas 64 out of 251 cases were diagnosed at stage IV, and received FOLFOX-based chemotherapy regimen.

The clinico-pathological and molecular features of patients included in these studies are described in Supplementary Tables 1 & 2.

TFAP2E gene

The *TFAP2E* (Transcription factor AP-2 epsilon) gene belongs to the AP-2 transcription factor family, which has five members (proteins encoded by *TFAP2A*, *TFAP2B*, *TFAP2C*, *TFAP2D*, and *TFAP2E* genes, respectively). The TFAP2 family controls cell fate specification, cell differentiation, cell survival, and cell proliferation within the neural crest, skin, breast epithelium, and other embryonic cell types as well as in stem cells^{1,2}.

Expression of AP-2 proteins occurs in various tissues, notably *TFAP2C* in the breast and *TFAP2E* in the skin. Interestingly, *TFAP2A* has been shown to be hypermethylated³ and acts as a tumor suppressor in various cancers including lung cancer, lymphoma and leukemia⁴⁻⁶. *TFAP2C* can act as a tumor suppressor in breast cancer,⁷ and may predict tamoxifen resistance through its relation to human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2)⁸. *TFAP2D* and *TFAP2E* have also been shown to be hypermethylated in

prostate and colorectal cancer⁹⁻¹¹. This evidence indicates that members of the TFAP2 family of genes not only play an important role in developmental biology but may also play an important role in cancer biology.

Supplementary Methods

Methylation analysis

We conducted two different pyrosequencing assays covering both CpG islands (located at the Promotor/Exon 1 and Intron 3) of *TFAP2E* gene. Bisulfite pyrosequencing for quantitative methylation analysis (PSQ HS 96A pyrosequencing system, QIAGEN) in bisulfite-modified genomic DNA (EZ DNA methylation Gold Kit, Zymo Research) was our standard method of methylation quantitation. Primers used in the study were designed using the PyroMark 1.0 design software (QIAGEN, Valencia, CA). Assays to assess methylation in DNA from FFPE Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded tissue were performed within specific CpG island regions in the gene promoter/Exon 1 and Intron 3 (**eTable 3**). PCR conditions were as follows: 15 min 94 °C for activation and then 50 cycles consisting of 30 sec 94 °C, 30 sec 50 °C and 30 sec 72 °C for the Promoter CpG island assay. The Intron 3 CpG Island assay conditions were the same except the annealing temperature was 52 °C. Mean percentage of methylation for all the CpG sites included in each assay was calculated for each CpG site.

We next calculated the threshold to distinguish methylated versus non-methylated samples using matched tissues from tumor (C) and adjacent mucosa (NC) in 41 CRC patients and measuring methylation by intron 3 pyrosequencing assay. For this purpose, a within-subject Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis was performed on measured TFAP2E methylation % values of patient-matched tumor-and non-tumor samples. The area under the ROC-curve was calculated to 0.73 (95% CI: 0.62-0.82), indicating that the probability of observing a higher TFAP2E value in a tumor-sample of a patient compared to its relative no-tumor sample is about 73%. The optimal % of methylation cut-off value was identified according to the Youden index at 40% i.e., the point on the curve farthest from chance. As a consequence, PMR values above 40% were considered as methylation positive (hypermethylation) and classified as "1", whereas % of methylation below 40% were considered as "0" (hypomethylation). This

cutoff was applied prospectively to the samples of the two independent patient cohorts (N=911).

TFAP2E IHC staining

A total of six tissue microarrays (TMA) were constructed from the 532 CRC patient specimens from the EPICOLON I cohort, from which tissues were available for IHC analyses. Two tissue cylinders with a diameter of 1 mm were punched out from selected areas and incorporated into a recipient paraffin block using a TMA instrument. Four mm thick sections were prepared from the TMA samples. The slides were placed on a TechMate 500 immunostainer and incubated for 20 min at room temperature, with primary polyclonal anti-TFAP2E antibody (1:800), and were detected using the EnVision technique (Dako, Denmark) according to the manufacturer's protocol.

Table 1. Characteristics of Epicolon I patients. MSI: Microsatellite Instability; MSS: Microsatellite stable.

Table 1 . Characteristics of Epicolon I patients	
Age, mean [SD]	70 [11]
Gender, n (%)	Male, 321 (60.4%)
	Female, 211 (39.6%)
TNM, n (%)	
	II, 227 (38.1%)
	III, 182 (30.5%)
	IV, 123 (20.6%)
Location, n (%)	Left colon, 357 (67.1%)
	Right colon, 175 (32.9%)
Grade, n (%)	Well, 488 (91.7%)
	Poor, 44 (8.3%)
Mucinous, n (%)	Yes, 71 (13.4%)

	No, 461(86.6%)
Follow-up (days), mean [SD]	1,163 [727]
MSI, n (%)	MSS, 486 (91.4%)
	MSI, 46 (8.6%)

eTable 2. Characteristics of Clinical cohort patients

Table 2 . Characteristics of Clinical patients	
Age, mean [SD]	64 [10]
Gender, n (%)	Male, 149 (59.6%)
	Female, 101 (40.4%)
TNM, n (%)	II, 72 (28.7%)
	III, 115 (45.8%)
	IV, 64 (25.5%)
Location, n (%)	Left colon, 182 (72.8%)
	Right colon, 68 (27.2%)
Grade, n (%)	G0, G1 158 (96.9%)
	G2, 5 (3.1%)
Mucinous, n (%)	Yes, 30 (17.1%)
	No, 145 (82.9%)
Follow-up, days,mean [SD]	1666 [896]

eTable 3. Primer sequences

Table 3. Primer sequences			
GENE	Primer sequence	Accession /Location	Usage /Method
TFAP2E NM_17854 8	Forward-5'- Biotin- AAAAGGGAGAGAATTGTTATAGT-3'	NM_178548/Promot or	Methylation/ Pyrosequencing
	Reverse-5'- CCTACTCCATACACTCCAATTATA-3'	NM_178548/Promot or	Methylation/ Pyrosequencing
	Sequence-5'-CCTACTCCATACACTCCAAT- 3'	NM_178548/Promot or	Methylation/ Pyrosequencing
	Forward-5'- GGGTTTTGGAATTAGAGAA- 3'	NM_178548/Intron3	Methylation/ Pyrosequencing
	Reverse-5'-Biotin- AAAACCCCAACCTTC-3'	NM_178548/Intron3	Methylation/ Pyrosequencing
	Sequence-5'- GATTTTTATAGTGTTTTTTAGTTT-3'	NM_178548/Intron3	Methylation/ Pyrosequencing
	Reverse-5'- CAAACCAACTCAACCCCAACAAAAC-3'	NC_000008.10	Bisulfite sequencing

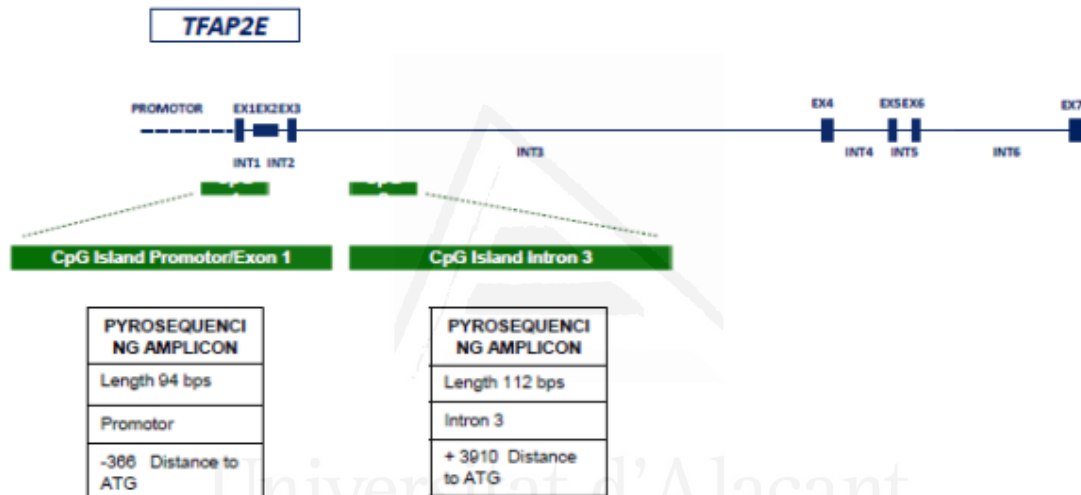
Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

eFigure 1. Schematic representation of *TFAP2E* gene.

The gene encoding transcription factor AP-2 epsilon (*TFAP2E*) is located on chromosome 1p34. In the schematic overview, exons are represented by blue boxes and introns with blue lines. The *TFAP2E* gene has two cytosine-phosphate-guanine (CpG) islands underscoring the potential of gene expression by means of CpG hypermethylation (green boxes). We used two quantitative methods, QMSP and pyrosequencing, covering both CpG islands in order to correlate methylation levels at these two locations.

eFigure 1

1. Schematic overview of *TFAP2E* gene, blue boxes, exons; CpG islands in green

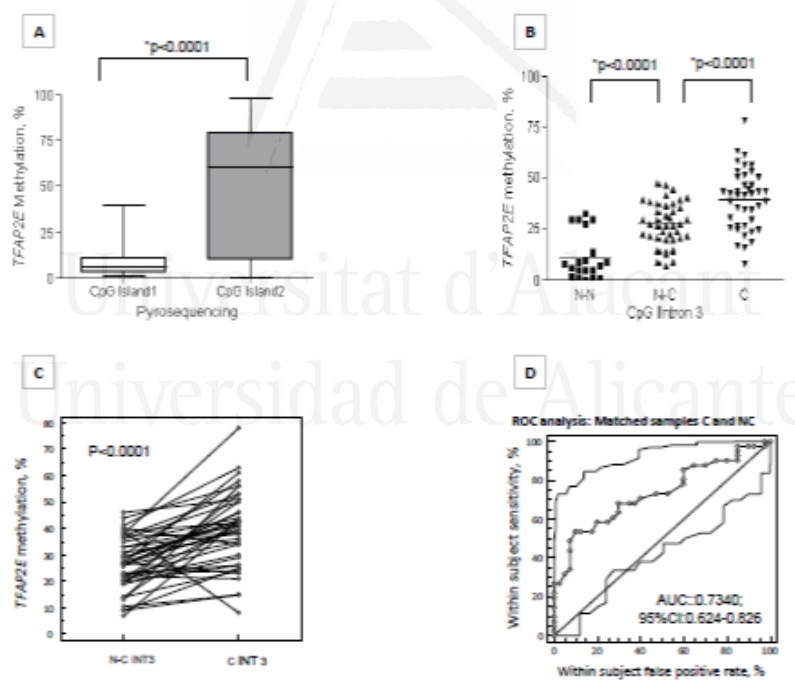


eFigure 2. Methylation analysis of *TFAP2E* CpG islands in CRC tissues. Calculation of cutoff value of *TFAP2E* Intron 3 methylation.

Results comparing methylation of the *TFAP2E* CpG1 (Promoter/Exon 1) and CpG2 (Intron 3) in CRC tissues (N=50) by (A) Bisulfite pyrosequencing (% Methylation) (B-C) Bisulfite pyrosequencing results of *TFAP2E* Intron 3 methylation in normal colon mucosa from healthy subjects N-N (N=21); and CRC patients-matched tumor-and non-tumor samples N-C (N=41);(N=41). (D) Within-subject Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis performed on measured *TFAP2E* % (percentage of methylation) values of patient-matched tumor- (N-N; N=21) and non-tumor (N-C; N=41) samples, respectively. The area under the ROC-curve was calculated as 0.73 (95% CI:0.62-0.82), indicating that the probability of observing a higher *TFAP2E* value in a tumor-sample of a patient compared to its related non-tumor sample is about 73%.

eFigure 2

Methylation analysis of *TFAP2E* CpG islands in CRC tissues. Calculation of cutoff value of *TFAP2E* Intron 3 methylation.

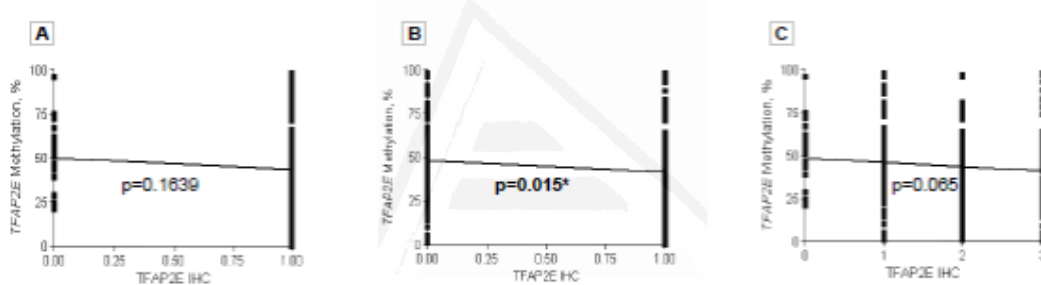


eFigure 3. Correlation between *TFAP2E* intron 3 methylation and IHC expression.

When methylation was analysed as a continuous variable using linear regression analysis, we observed a trend towards negative correlation with IHC protein expression; however, this correlation was significant only when combining lack of and low *TFAP2E* expression (IHC scores 0 & 1) versus strong *TFAP2E* staining (IHC scores 2 & 3) ($p= 0.015$). Linear regression analysis comparing *TFAP2E* methylation and expression in CRC tissues (N=314) using IHC results by binary scoring system: positive/negative (A) staining scores 0 & 1 vs 2 & 3(B) and the staining intensity scale 0 to 3 (C). Correlation and performance measures between *TFAP2E* methylation and expression in CRC tissues using IHC and methylation qualitative results (staining scores 0 & 1 vs 2 & 3); (D).

eFigure 3

Correlation between *TFAP2E* intron 3 methylation and IHC expression



D

TFAP2E Methylation	TFAP2E protein IHC	
	Positive (Strong staining)	Negative (lost and/or weak staining)
Positive	216	141
Negative	184	66

$p=0.017$ by Fisher's exact test

% (95%CI)			
Se	Sp	PPV	NPV
68.2 (61.2-74.5)	46.0 (40.9-51.1)	39.6 (34.4-45.0)	73.6 (67.5-79.0)

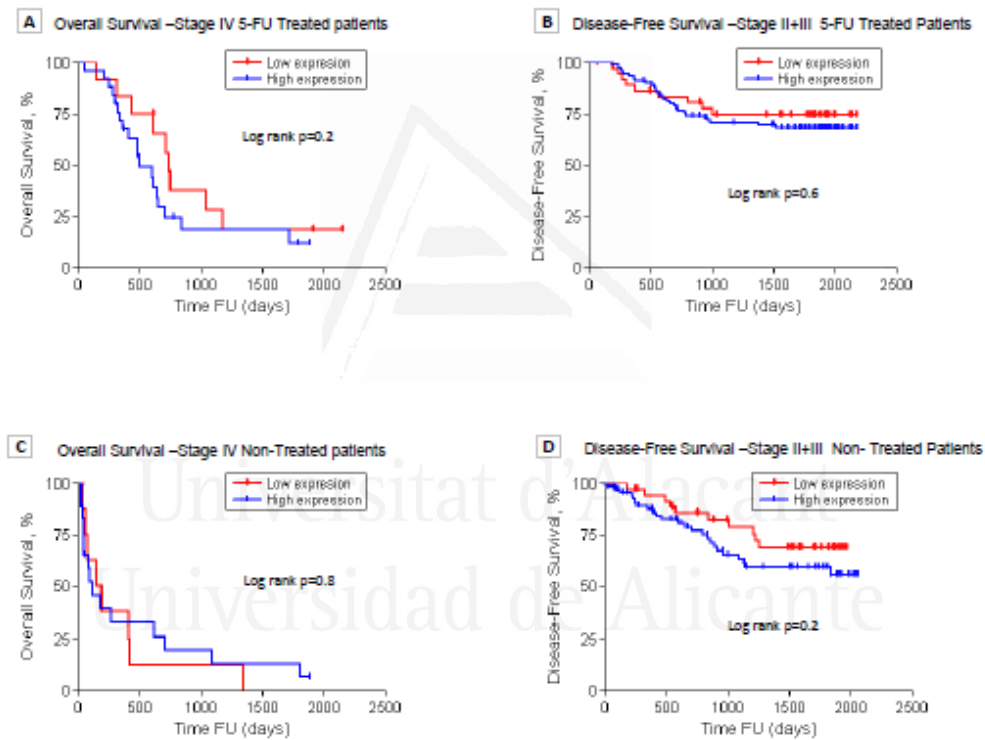
Abbreviations: OR: Odds Ratio; CI : Confidence Interval; Se: sensitivity; Sp: Specificity; PPV: Positive Predictive Value; NPV: Negative Predictive Value

eFigure 4. Epicolon I. Overall Survival Stage IV Patients: TFAP2E IHC Expression. Disease Free Survival Stage II and III Patients: TFAP2E IHC Expression.

(A) 5-FU based chemotherapy according to TFAP2E expression status. (B) Disease Free Survival (DFS) of patients with stage II and III CRC, according to TFAP2E expression status comparing staining scores 0 & 1 (Low expression) vs staining scores 2 & 3 (High expression) (C). DFS of stages II+III CRC patients that received or did not receive (D) adjuvant chemotherapy according to TFAP2E expression status.

eFigure 4

Epicolon I. Overall and Disease Free Survival Stage II–IV Patients. TFAP2E IHC Expression



Supplementary References

1. Eckert D, Buhl S, Weber S, et al: The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* 6:246, 2005
2. Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, et al: Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260:1-12, 2000
3. Dalgin GS, Drever M, Williams T, et al: Identification of novel epigenetic markers for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 180:1126-30, 2008
4. Rauch TA, Wang Z, Wu X, et al: DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumour Biol* 33:287-96, 2012
5. Pike BL, Greiner TC, Wang X, et al: DNA methylation profiles in diffuse large B-cell lymphoma and their relationship to gene expression status. *Leukemia* 22:1035-43, 2008
6. Tong WG, Wierda WG, Lin E, et al: Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics* 5:499-508, 2010
7. Woodfield GW, Horan AD, Chen Y, et al: TFAP2C controls hormone response in breast cancer cells through multiple pathways of estrogen signaling. *Cancer Res* 67:8439-43, 2007
8. Guler G, Iliopoulos D, Guler N, et al: Wwox and Ap2gamma expression levels predict tamoxifen response. *Clin Cancer Res* 13:6115-21, 2007
9. Chung W, Kwabi-Addo B, Ittmann M, et al: Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. *PLoS One* 3:e2079, 2008
10. Makhov PB, Golovine KV, Kutikov A, et al: Reversal of epigenetic silencing of AP-2alpha results in increased zinc uptake in DU-145 and LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 32:1773-81, 2011

11. Payne SR, Serth J, Schostak M, et al: DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection. *Prostate* 69:1257-69, 2009
12. Sato H, Suzuki H, Toyota M, et al: Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 28:2459-66, 2007



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante