

FIRMAS GÉNICAS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CÁNCER DE RECTO

Memoria para la obtención del título de Doctor

Raquel Conde Muíño

Directores: Dr. J. Antonio Ferrón Orihuela
Dr. Pablo Palma Carazo
Dra. Marta Cuadros Celorrio



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Cirugía y Sus Especialidades

Granada, Diciembre 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Raquel Conde Muño
D.L.: GR 1029-2014
ISBN: 978-84-9028-979-2

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera dedicar unas palabras a agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, brindándome su conocimiento, su apoyo y su ayuda. Sin su colaboración no habría podido concluir este trabajo.

Para comenzar, quisiera agradecer al Dr. Ferrón, director de mi Tesis y Jefe de Servicio de Cirugía General, por haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran equipo y por todo el apoyo recibido para permanecer en él y seguir formándome como cirujana e investigadora.

Al Dr. Palma, director de mi Tesis y Jefe de Sección de Coloproctología, porque a él le debo buena parte de lo que he aprendido a lo largo de estos años compartidos, no sólo en cirugía, sino también en otros muchos aspectos, por su comprensión y apoyo en los momentos difíciles y porque ha sido un ejemplo para mí.

A la Dra. Marta Cuadros, directora de mi tesis, por su enorme energía y positividad, porque me ha aportado un punto de vista diferente de la investigación ayudándome a profundizar en el estudio de los genes, y a aclarar un poco su complejidad. Ella también ha sabido estimularme en los momentos flojos y siempre me ha animado a seguir adelante.

Al Dr. Pablo Bueno, investigador de la Unidad de Cirugía Experimental, y las Lcdas. Carmen Olmedo y Ana María Comino, por su inestimable ayuda y colaboración en el procesado de las muestras biológicas y en la realización de las técnicas de laboratorio.

Al Profesor Armando Blanco y al Dr. Carlos Cano, del Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial, por su gran ayuda en el análisis y validación de los datos de los *microarrays*.

A Manuela Expósito y Mari Carmen Olvera, miembros de la Unidad de Apoyo a la Investigación, por su gran colaboración y enseñanzas en la estadística de esta Tesis.

A la Dra. María José Sánchez, del Registro de Tumores de Granada, por su colaboración a la hora de obtener datos sobre el cáncer de recto en nuestra provincia y por su rápida respuesta.

A Ángela Salmerón por su ayuda con la estadificación, en especial con la resonancia magnética.

A todos los miembros del Servicio de Cirugía General del HUVN y, en especial, a los compañeros de la Sección de Coloproctología, por compartir tantas horas de trabajo haciéndolas más llevaderas.

A todo el personal de quirófano, pero en especial al Eugenio Coll, por su colaboración durante la recogida de muestras.

A todos mis amigos, por los buenos momentos compartidos en estos años, por escucharme, aconsejarme y animarme.

A mis padres, porque ellos me han enseñado los verdaderos valores de la vida, porque ellos me han apoyado y guiado siempre en los proyectos que he llevado a cabo y por su amor incondicional.

A mis tíos Tere y Pepín, porque ellos me han enseñado mucho, me han guiado en momentos difíciles y porque siempre han sido un ejemplo para mí.

A Patricia, mi hermana, porque a lo largo de mi vida siempre ha estado ahí, aportándome confianza y siendo mi mejor amiga.

Y por último, pero no menos importante, a mi marido, Pablo, y a mis hijos, Andrea, Sara y Adrián, porque ellos son el motor de mi vida, generadores de energía positiva y de tantos momentos felices.

A todos ellos, muchas gracias.

“La vida sólo se puede entender mirando hacia atrás,
pero sólo se puede vivir mirando hacia delante”.

Soren Kierkegaard

RESUMEN

Introducción

En la actualidad, la radioquimioterapia preoperatoria desempeña un papel básico en el manejo multidisciplinar del cáncer de recto localmente avanzado, consiguiendo mejorar el control local de la enfermedad. Sólo un pequeño porcentaje de pacientes (20-40%) muestran una buena respuesta al tratamiento y no existe ninguna prueba diagnóstica fiable que nos permita identificar qué pacientes se van a beneficiar. Además, el tratamiento neoadyuvante, no está exento de efectos adversos como incontinencia fecal, lesiones nerviosas, complicaciones sépticas, entre otras, que sería deseable evitar precisamente en los pacientes no respondedores, así como ser capaces de poder ofrecerles una alternativa terapéutica dentro del concepto de lo que se ha denominado medicina individualizada.

El objetivo de éste estudio es la identificación de genes predictores de respuesta al tratamiento neoadyuvante en pacientes con adenocarcinoma de recto localmente avanzado mediante la tecnología de *microarrays*.

Material y Métodos

Se tomaron biopsias de tejido tumoral antes de iniciar la neoadyuvancia, a las cuales se les extrajo el material genético que se utilizó para hibridar con *microarrays* de ADN (genoma completo) y se determinaron los genes sobre-expresados en cada muestra. Los pacientes recibieron radioquimioterapia durante 5 semanas (50,4 Gy en 28 fracciones de 1,8 asociado a capecitabina o capecitabina y oxaliplatino), seguido de un período de latencia de 8 semanas. Posteriormente, se intervinieron mediante la técnica habitual de escisión mesorrectal completa. La respuesta al tratamiento se evaluó mediante los grados de remisión tumoral de Mandard en la pieza quirúrgica, clasificándose como sujetos respondedores los grados 1 y 2 y como no respondedores los grados 3-4-5. Esta respuesta se relacionó con los perfiles genéticos.

Los resultados obtenidos se validaron mediante qRT-PCR. Para profundizar en el conocimiento de este perfil genético se cotejaron los datos mediante la herramienta informática IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*), determinando las vías metabólicas en las que están implicados. Por último, mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) e inmunohistoquímica (IHQ) se trató de identificar el mecanismo de sobre-expresión del gen más representativo, c-MYC, así como la correlación con la expresión de la proteína c-MYC en las biopsias de tejido tumoral.

Resultados

Se comprobó que existía un grupo compuesto por 257 genes cuya sobre-expresión se asoció a una buena respuesta a la neoadyuvancia. Se validaron mediante qRT-PCR cuatro de ellos: c-MYC, GNG4, POLA y RRM1. Estos 257 genes se relacionaron, sobre todo, con la ruta de c-MYC, metabolismo de las pirimidinas y señalización celular o con la proliferación y crecimiento celular.

Los datos de la FISH demostraron que los pacientes respondedores, con sobre-expresión de ARNm de c-MYC, tenían un número normal de copias del gen a nivel del ADN y, por lo tanto, el mecanismo de sobre-expresión es independiente de la amplificación. Al realizar la tinción con IHQ se comprobó que todos los tumores, respondedores o no, tenían sobrepresada la proteína c-MYC a nivel del núcleo celular, mientras que estaba ausente en todas las muestras de tejido normal. Podría así comportarse como un marcador de malignidad.

La sobre-expresión de los cuatro genes validados, c-MYC, GNG4, POLA y RRM1, en muestras de tejido tumoral antes de iniciar la neoadyuvancia ha demostrado una buena correlación con la respuesta, especialmente para c-MYC (sensibilidad del 60% y especificidad del 100%).

Cuando se evaluó la firma génica en su conjunto, es decir c-MYC, GNG4, POLA y RRM1, también se obtuvo una buena capacidad de predicción de respuesta. Los pacientes con sobre-expresión de tres de los cuatro genes serán respondedores con una alta especificidad (100%) y valor predictivo positivo (100%) y con una sensibilidad, valor predictivo negativo y una exactitud algo más bajas (del 60%, 80% y 85%, respectivamente).

Conclusiones

Existe un perfil genético en muestras de adenocarcinoma de recto localmente avanzado que se asocia a buena respuesta a la radioquimioterapia preoperatoria. El gen con mejor capacidad de predicción es c-MYC. Se ha descartado que esta sobre-expresión se deba a amplificación del gen. A nivel proteico no hay diferencias en cuanto a la presencia de proteína c-MYC entre pacientes respondedores y no respondedores.

INDICE

OBJETIVOS.....	19
HIPÓTESIS.....	23
INTRODUCCIÓN.....	27
1. Epidemiología del cáncer de recto.....	29
2. Etiología del cáncer de recto esporádico.....	29
2.1 Factores ambientales.....	29
2.2 Factores genéticos.....	33
3. Síndromes de cáncer colorrectal hereditario.....	35
3.1 Síndromes de poliposis.....	35
3.2 CCR hereditario no polipósico o síndrome de Lynch.....	37
3.3 Cáncer familiar colorrectal tipo X.....	38
3.4. Cáncer colorrectal familiar.....	39
4. Diagnóstico y estadificación del CCR.....	39
4.1 Cuadro clínico.....	39
4.2 Estadificación.....	40
4.3 Diagnóstico histopatológico.....	45
5. Tratamiento del cáncer de recto.....	47
5.1 Tratamiento quirúrgico del cáncer de recto.....	47
5.2 Tratamiento neoadyuvante.....	49
5.3 Evaluación de la respuesta a la radioquimioterapia.....	58
6. Aplicación de los microarrays.....	62
6.1 Introducción.....	62
6.2 Fundamentos biológicos de los microarrays.....	62
6.3 Tipos de microarrays.....	63
6.4 Tecnología de microarrays de expresión génica.....	65
6.5 Análisis de microarrays de expresión.....	66
6.6 Aplicaciones de los microarrays de expresión.....	69
6.7 Limitaciones de los microarrays de expresión génica.....	70
7. Hibridación in situ fluorescente.....	72
MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1. Metodología de la investigación.....	77
2. Protocolo de estudio.....	79

2.1 Flujo de pacientes.....	79
2.2 Diagnóstico y estadificación.....	79
2.3 Toma de muestra pretratamiento neoadyuvante.....	85
2.4 Tratamiento neoadyuvante.....	86
2.5 Tratamiento quirúrgico.....	86
2.6 Estadificación anatomopatológica postquirúrgica.....	87
2.7 Valoración de la respuesta al tratamiento neoadyuvante.....	87
2.8 Análisis de supervivencia.....	88
3. Descripción del microarray.....	89
4. Preparación de la muestra e hibridación de los microarrays.....	90
4.1 Aislamiento, precipitación, cuantificación y la calidad del ARN.....	90
4.2 Preparación e hibridación de los microarrays.....	92
5. Análisis de los datos de expresión de microarrays	95
5.1 Normalización.....	95
5.2 Significance Analysis of Microarrays (SAM).....	96
5.3 Agrupamiento (clustering).....	98
5.4 Análisis de las vías metabólicas.....	99
6. Validación de los resultados de los microarrays: qRT-PCR.....	100
7. Cálculo de la capacidad de predicción de la firma génica.....	107
8. Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	107
8.1 Protocolo.....	108
9. Inmunohistoquímica.....	109
RESULTADOS.....	111
1. Características de la muestra.....	113
2. Resultado de los perfiles de expresión génica de la muestra.....	117
2.1 Genes expresados diferencialmente entre el grupo con respuesta y no respuesta al tratamiento.....	117
2.2 Estudio de las vías metabólicas en las que participan los genes diferencialmente expresados entre respondedores y no respondedores	120
2.3 Validación mediante RT-PCR cuantitativa.....	124
3. Valor predictivo.....	125
3.1 Curvas ROC de c-MYC, POLA, RRM1 y GNG4.....	125
3.2 Capacidad predictiva (valor predictivo positivo) de la firma génica.....	127
4. Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	127
5. Inmunohistoquímica: expresión proteica de c-MYC	129

DISCUSIÓN.....	131
1. Predicción de respuesta utilizando microarrays de expresión en biopsias de tejido.....	136
2. Predicción de respuesta utilizando microarrays de expresión en sangre periférica.....	141
3. Predicción de respuesta utilizando microarrays de expresión en líneas celulares...	142
4. Predicción de respuesta utilizando microarrays de micro-ARN.....	143
5. Predicción de respuesta utilizando SAGE (serial analysis of gene expression).....	145
6. c-MYC.....	145
7. Limitaciones de la presente Tesis Doctoral.....	147
CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFÍA.....	155
ANEXOS.....	169
Anexo 1. Consentimiento informado.....	171
Anexo 2. Tabla de genes sobre-expresados en pacientes respondedores.....	173
Anexo 3. Publicaciones y premios que avalan esta Tesis Doctoral.....	181

INDICE DE ABREVIATURAS

18 FDG: 18 fluorodeoxiglucosa.

5FU: 5 fluoruracilo.

AAP: amputación abdomino-perineal.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

AJCC/IUCC: American Joint Comettee of Cancer/Unión Internacional Contral el Cáncer.

APC: gen de la poliposis adenomatosa familiar.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNc: ácido ribonucleico complementario.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

CCR: cáncer colorrectal.

CEA: antígeno carcinoembrionario.

cTNM: estadificación clínica TNM.

DCC: gen *Deleted in Colorectal Carcinoma*.

FISH: hibridación in situ fluorescente (*Fluorescence in situ hybridation*)

FRFSE: fast recovery fast spin-echo, secuencia de realización de RMN.

HNPCC: cáncer colorrectal hereditario no polipósico.

HUVN: Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

IMS: inestabilidad de microsatélites.

LOOCV: *Leave-one-out-cross-validation* (técnica estadística).

MiARN: Micro ARN.

MMR: sistema de reparación del ADN (*mismatch repair*).

NCI: National Cancer Institute.

PCR: reacción en cadena de polimerasa.

PET/TC: tomografía de emisión de positrones/tomografía computerizada.

qRT-PCR: reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real.

RAA: resección anterior alta.

RAB: resección anterior baja.

RMN: resonancia nuclear magnética.

RNasas: ribonucleasas.

RPC: respuesta patológica completa.

RQT: radioquimioterapia.

RTOG/EORTC: Radiation therapy Oncology Group/ European Organization for Research and Treatment of Cancer.

SAM: análisis de significación de los *microarrays* (*significance analysis of microarrays*).

SUV: valor de captación estándar (*Standard uptake value*).

TC: tomografía computerizada.

TRG: grados de remisión tumoral (*Tumor regression grade*).

Wnt: vía de señalización wingless (*wingless signaling pathway*).

ypRC: respuesta patológica completa tras neoadyuvancia.

ypTNM: estadificación anatomopatológica en la pieza quirúrgica tras neoadyuvancia.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mutaciones y cambios histológicos de la secuencia adenoma-carcinoma.....	33
Figura 2. Secuencia de mutaciones en la vía pólipo serrado-carcinoma.....	35
Figura 3. Imagen de estadificación del CCR mediante RMN.....	41
Figura 4. Interacción de la capecitabina y 5FU en la vía metabólica de la timidina.....	53
Figura 5. Dogma central de la biología molecular.....	63
Figura 6. Matriz de expresión genética obtenida de los experimentos de hibridación de <i>microarrays</i>	66
Figura 7. Imagen de estadificación de la RMN.....	82
Figura 8. Imagen de estadificación mediante PET/TC.....	84
Figura 9. Cálculo del índice SUV.....	85
Figura 10. Pieza quirúrgica de resección de recto con escisión mesorrectal completa.....	86
Figura 11. Dos muestras de Anatomía Patológica (TRG1 y TRG4).....	88
Figura 12. Proceso de extracción del ARN del tejido tumoral.....	91
Figura 13. Ejemplo de gráfico obtenido con el Bioanalizador Experion®.....	92
Figura 14. Esquema general del proceso de extracción del ARN, marcaje, hibridación en el microarray y posterior escaneo de los cristales.....	94
Figura 15. Gráfica MA para 8 microarrays del estudio.....	95
Figura 16. Diagramas de cajas de normalización de los microarrays.....	96
Figura 17. Diagramas de cajas de la normalización.....	96
Figura 18. Ejemplo gráfico del análisis de significación de los microarrays (SAM).....	98
Figura 19. Dendograma correspondiente a la agrupación jerárquica de los patrones de expresión de los genes.....	99
Figura 20. Cinética de las reacciones de PCR.....	101
Figura 21. Esquema del mecanismo de acción de las sondas intercalantes.....	101
Figura 22. Esquema del mecanismo de acción de las sondas Taqman.....	102
Figura 23. Gráfico de los resultados de la RT-PCR cuantitativa.....	106
Figura 24. Respuesta anatomopatológica medida según los grados de remisión tumoral de Mandard, en los pacientes del estudio	115
Figura 25. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes incluidos en el estudio.....	116
Figura 26. Comparación de la supervivencia libre de enfermedad según su respuesta al tratamiento.....	117

Figura 27. Agrupamiento en dendrograma de los 257 genes.....	119
Figura 28. Ruta de c-MYC propuesta por el programa IPA.....	122
Figura 29. Diagramas de cajas y bigotes que representan los valores de expresión mediante qRT-PCR de los genes GNG4, c-MYC, POLA y RRM1.....	125
Figura 30. Curvas ROC de c-MYC y RRM1.....	126
Figura 31. Curvas ROC de POLA y GNG4.....	127
Figura 32. Análisis mediante hibridación in situ fluorescente.....	129
Figura 33. Expresión inmunohistoquímica de la proteína c-MYC en muestras de tejido tumoral y sano.....	130
Figura 34. Esquema de los perfiles de expresión genética predictivos de respuesta a la radioquimioterapia que se han publicado y sus puntos en común.....	140
Figura 35. Procesos celulares controlados por c-MYC.....	146

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de Amsterdam para el diagnóstico de síndrome de Lynch.....	38
Tabla 2. Criterios de Bethesda para el diagnóstico del síndrome de Lynch.....	38
Tabla 3. Clasificación del tumor según TNM de AJCC/UICC: invasión del tumor primario (T), de los ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis a distancia (M).....	44
Tabla 4. Clasificación por estadios del cáncer de recto.....	45
Tabla 5. Niveles de invasión profunda del carcinoma: <i>Niveles de Haggitt</i>	46
Tabla 6. Clasificación histológica de los tumores de recto.....	47
Tabla 7. Clasificación del tumor según TNM de AJCC/UICC.....	80
Tabla 8. Parámetros de realización de las distintas secuencias de la RMN para la estadificación del cáncer de recto.....	82
Tabla 9. Preparación de la mezcla de reacción del protocolo qRT-PCR.....	103
Tabla 10. Secuencia de cebadores y sondas de los 20 genes analizados por qRT-PCR.....	104
Tabla 11. Características de los pacientes incluidos en el estudio.....	114
Tabla 12. Características (pacientes y tratamiento) del grupo con respuesta y no respuesta.....	116
Tabla 13. Nombre del gen, número de veces (fold) que está sobre-expresado el gen en los respondedores respecto a los no respondedores y número de identificación de secuencia del GenBank, NCBI, (CodeLink ID).....	118
Tabla 14. Genes que el programa IPA demostró relacionados con c-MYC.....	123
Tabla 15. Puntos de corte, área bajo la curva, sensibilidad y especificidad para los microarrays de cada uno de los genes validados mediante PCR.....	126
Tabla 16. Resultados obtenidos del FISH de c-MYC y CEP8 en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.....	128
Tabla 16. Resultados de la expresión de proteína c-MYC mediante inmunohistoquímica.....	130
Tabla 17. Características y resultados de los principales estudios publicados de microarrays como predictores de respuesta a la radioquimioterapia en cáncer de recto.....	137

OBJETIVOS

Determinar marcadores biológicos de respuesta al tratamiento neoadyuvante con radioquimioterapia en pacientes con adenocarcinoma de recto localmente avanzado:

Objetivo principal

1. Establecer los perfiles de expresión genética en biopsias de tejido tumoral antes del tratamiento neoadyuvante en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.

Objetivos secundarios

1. Analizar los perfiles de expresión por vías metabólicas (categoría ontológica).
2. Determinar la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el negativo de los resultados de expresión génica sobre la respuesta tumoral al tratamiento neoadyuvante con radioquimioterapia.
3. Correlacionar los resultados obtenidos de los perfiles de expresión con la recidiva local y la supervivencia libre de enfermedad entre los pacientes respondedores y no respondedores a 3 años.

HIPÓTESIS

Existe un conjunto de genes (perfil o firma) en muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado cuya expresión se asocia a buena respuesta a la radioquimioterapia preoperatoria.

La posibilidad de determinar perfiles de expresión génica en tumores de recto ayudará a definir grupos de pacientes sensibles o no al tratamiento con radioquimioterapia. Esto proveerá beneficios clínicos a los pacientes (medicina personalizada), así como también beneficios económicos a los Sistemas Sanitarios. El impacto clínico puede ser relevante en tanto los regímenes de radioquimioterapia son largos, costosos y llevan consigo un aumento importante de efectos secundarios, incluida la morbilidad quirúrgica, y por tanto afectan a la calidad de vida del paciente. Se evitarán así procedimientos innecesarios y se podrían ofrecer terapéuticas personalizadas a cada enfermo.

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del cáncer de recto

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tumor más frecuentemente diagnosticado en varones, precedido sólo por el de pulmón y el de próstata, y el segundo en mujeres después del cáncer de mama. La incidencia estimada en el 2011 fue de 663.600 y 570.100 nuevos casos al año para hombres y mujeres respectivamente¹. Se estima que provocó alrededor de 608.700 muertes en ese mismo año en todo el mundo.

Incidencia del CCR en Granada (2003-2007)

El registro específico de la provincia de Granada incluye un total de 880.000 habitantes. Durante el período de tiempo 2007-2009, el cáncer de colon fue la 5ª neoplasia más frecuente en varones y la 3ª en mujeres en esta provincia. Las tasas brutas de incidencia media anual fueron de 41 y 31 casos por 100.000 hombres y mujeres, respectivamente. Las tasas acumulativas, calculadas hasta los 74 años, fueron de 2,8 y 1,8 por 100 habitantes para hombres y mujeres respectivamente.

En cuanto al cáncer de recto ocupó la 6ª posición en orden de frecuencia en hombres, mientras que en las mujeres fue la 5ª. En dicho periodo, la incidencia media anual en Granada presentó unas tasas brutas de 25 y 14 por 100.000 hombres y mujeres respectivamente. La incidencia fue más elevada en los hombres que en las mujeres, con una razón de tasas estandarizadas hombre/mujer de 1,8. Por otro lado las tasas acumulativas, calculadas hasta los 74 años, fueron de un 1,7% y un 0,9% para hombres y mujeres respectivamente, lo que significa que si las tendencias no se modifican, y en ausencia de otra causa de muerte, 1 de cada 59 hombres y 1 de cada 111 mujeres, residentes en la provincia de Granada, desarrollará un cáncer de recto antes de los 75 años.

2. Etiología del CCR esporádico

2.1 Factores ambientales

Obesidad

La obesidad y la ingesta calórica total son factores de riesgo independientes en el CCR. En los últimos años, las distintas investigaciones sugieren que este riesgo podría ser consecuencia del equilibrio energético. El exceso de grasa corporal y obesidad abdominal son factores de riesgo de CCR según el estudio publicado en 2007 por la Fundación para la

Investigación Mundial sobre el Cáncer (World Cancer Research Fund, 2007)². Según los datos citados, conforme aumenta el índice de masa corporal también lo hace el riesgo de cáncer.

El exceso de energía en forma de un aumento de peso significativo da lugar al desarrollo de una resistencia a la insulina, con aumento secundario de las concentraciones circulantes de insulina, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados. Estos cambios suponen un estímulo proliferativo para las células epiteliales del colon y exponen a un mayor número de células en división a productos intermediarios reactivos del oxígeno (especies reactivas de oxígeno)^{3, 4}. Las concentraciones excesivas de factores estimulantes del crecimiento posiblemente favorecerían la proliferación de células epiteliales del colon que ya presentan un control defectuoso del ciclo celular. Además de la estimulación de la proliferación celular, parece existir una pérdida focal de la función de barrera normal de las células epiteliales, que ocasiona inflamación local y liberación de radicales libres de oxígeno.

La obesidad se asocia a una inflamación sistémica crónica. Al igual que en el cáncer de mama, factores derivados de los adipocitos se han asociado a la mediación de la respuesta inflamatoria en el CCR. La leptina derivada de los adipocitos aumenta la producción TNF- α y la insulina ha demostrado aumentar la IL-6 de los adipocitos. Tanto el TNF- α como la IL-6 son promotores de inflamación crónica induciendo proliferación celular y su supervivencia, asociándose por tanto a un proceso inflamatorio crónico de la mucosa colónica que podría ser la causa del desarrollo de CCR⁴.

Carne, Grasa y Proteínas

La ingesta de carnes rojas, carnes procesadas o el total de carne consumida se ha asociado a un incremento del riesgo de CCR, siendo éste de un 28% a un 35% para la ingestión de carne roja mientras que la carne procesada se relaciona con un riesgo aumentado de entre un 20% y un 49%⁵.

Los mecanismos biológicos que podrían inducir esta carcinogénesis serían la formación de derivados nítricos (entre ellos las nitrosaminas), aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estos efectos no se han observado en carnes blancas o en el pescado⁶. Las carnes rojas y la ingesta de hierro en forma de hemo se han asociado a aumento en la concentración fecal de compuestos nítricos, algunos de los cuales son carcinogénicos. Las carnes rojas procesadas tienen un mecanismo similar, además de que ya llevan los compuestos nitrogenados, que son capaces de reaccionar con el ADN alterando las bases y por lo tanto facilitando carcinogénesis⁷. La carne cocinada a altas temperaturas también contiene agentes carcinogénicos (aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos), aunque el riesgo de carcinogénesis depende de la activación de estos componentes por enzimas⁷.

Los componentes grasos de la carne roja podrían ser promotores de la carcinogénesis, ya que estas grasas son metabolizadas por bacterias intraluminales a agentes carcinógenos⁸, lo que resulta en una proliferación anormal del epitelio colónico.

La dieta rica en grasas de origen animal también se ha asociado a aumento de carcinogénesis de origen colorrectal, sin embargo la evidencia científica es limitada y no se ha podido corroborar esta teoría².

Pescado

La ingesta de pescado rico en ácidos grasos omega-3 se ha asociado a un efecto protector del CCR, quizá por la participación de estos ácidos grasos en las membranas celulares y sus efectos sobre la inflamación^{9,10}.

Fibra

Clásicamente, el consumo elevado de fibra en la dieta ha sido sinónimo de una baja incidencia de CCR. Se pensaba que el consumo de la misma diluía los carcinógenos fecales, disminuía el tiempo de tránsito colónico y generaba un entorno luminal favorable. Sin embargo, en estudios posteriores (metanálisis y *pooled* análisis) no se encontró tal evidencia, al no poder separarse el efecto de la fibra de otros componentes alimentarios².

Un metanálisis reciente de 25 estudios prospectivos encuentra una disminución del riesgo relativo de desarrollar CCR del 10% con un consumo de 10 g de fibra total al día¹¹ y una disminución del 38% del riesgo relativo en aquellos individuos cuyo consumo de fibra provenía principalmente de las legumbres, aportando suficiente evidencia, según la World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, para confirmar la fibra como un factor preventivo del cáncer colorrectal¹².

Hortalizas y Frutas

El consumo de vegetales en general, y de verduras en particular, parece asociarse constantemente a una reducción del riesgo de padecer CCR. La posible función de las vitaminas antioxidantes, como captadoras de radicales libres de oxígeno para reducir el riesgo de cáncer, también ha sido estudiada, si bien, los resultados no son concluyentes¹³.

Recientes metanálisis parecen confirmar la relación inversa entre la ingesta de suplementos de ácido fólico y el riesgo de CCR, aunque las dosis, el tipo de folato y el momento en que se debe tomar no está todavía aclarado^{14, 15}. El ácido fólico proporciona un grupo metilo que se requiere en la síntesis de metionina, empleada en la metilación del ADN y en la regulación de la expresión génica. También proporciona otro grupo metilo para la

conversión de uracilo en timina. La deficiencia de ácido fólico puede hacer que el uracilo remplace a la timina en la síntesis de ADN.

Leche y suplementos de calcio

Estudios epidemiológicos y experimentales han indicado que los suplementos de calcio podrían tener un efecto protector, en tanto que reduce los cambios de hiper-proliferación subyacentes a la transformación maligna. También hay cierta evidencia de que la leche (posiblemente por su contenido en calcio) disminuye el riesgo de padecer CCR².

Estilo de vida

Estudios prospectivos parecen arrojar suficiente evidencia científica para afirmar que cuanto más aumenta la actividad física de una persona, así como la intensidad y la frecuencia del ejercicio, menor es el riesgo de padecer CCR. Si se estratifica por localización parece que la relación es más clara con el cáncer de colon, pero no parece tener el mismo efecto con el cáncer de recto².

Alcohol

La ingesta moderada o importante de alcohol se ha asociado a un mayor riesgo de padecer CCR en comparación con los no bebedores (incremento del riesgo del 21% y 52%, respectivamente). Este efecto es mayor en los varones que en las mujeres, quizá por una mayor ingesta alcohólica en ellos, o por diferencias hormonales o debidas a la diferente susceptibilidad al alcohol^{2,16}.

Tabaquismo

El hábito de fumar durante un periodo de tiempo largo (entre 35-40 años) o una gran cantidad de cigarrillos al día (más de 20) se asocia con un aumento del CCR¹⁷, que podría deberse a una afectación del sistema de reparación del ADN¹⁸ o con una interacción entre el tabaco y diversos polimorfismos genéticos¹⁹.

Antiinflamatorios no esteroideos

En estudios poblacionales se observó la asociación inversa entre el consumo de aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos y la incidencia de CCR y adenomas. Estos estudios sirvieron de base para ensayos controlados y aleatorizados que demuestran que las dosis bajas de aspirina previenen la formación de adenomas tanto en población normal como en la de alto riesgo²⁰ y también el desarrollo de CCR²¹.

Terapia hormonal sustitutiva

Estudios observacionales hacen pensar que el uso de la terapia hormonal sustitutiva (THS) durante la menopausia se asocia a una disminución en la incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal. El metanálisis de Grodstein demostró una reducción de un 20% en el riesgo de CCR en mujeres tratadas con THS²². Sin embargo, un reciente metanálisis de la Cochrane no ha podido confirmar este efecto beneficioso²³. El posible mecanismo es la reducción en la secreción de ácidos biliares (promotor o inductor del CCR) así como a la acción directa de los estrógenos sobre el epitelio colónico. Los estrógenos parecen proteger de la inestabilidad de microsátélites (IMS), mientras que la ausencia en mujeres mayores parece aumentar la incidencia de CCR asociado a IMS²⁴. Sin embargo, la THS supone un elevado riesgo de padecer cáncer de mama, así como eventos vasculares, pudiendo ser mayores los efectos adversos que los beneficios del tratamiento²⁵.

Enfermedad inflamatoria intestinal

Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal de larga evolución tienen mayor riesgo de padecer lesiones displásicas y que éstas progresen a cáncer colorrectal. Éste riesgo comienza a aumentar a partir de los 10 años y es progresivo según aumenta la duración y la extensión de la enfermedad. Aunque varía según los estudios, la incidencia acumulativa anda en torno a 5-10% tras 20 años y en torno al 12-20% tras 30 años de enfermedad²⁶.

Colecistectomía

Algunos estudios han asociado la colecistectomía o alteraciones en el metabolismo de las sales biliares con el cáncer de colon proximal y recto, sin que estos resultados hayan sido demostrados definitivamente²⁷⁻³⁰.

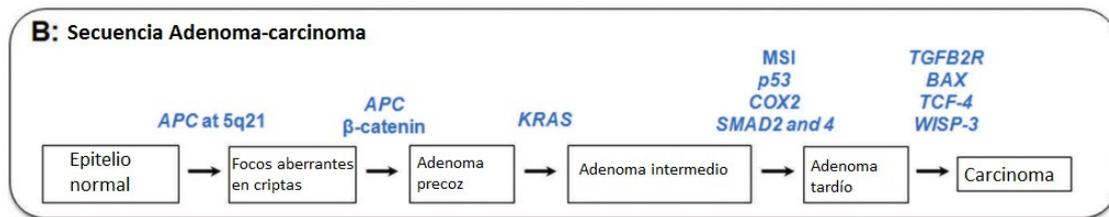
2.2 Factores genéticos

En torno a un 80% de los casos de cáncer colorrectal son esporádicos y no se asocian a ninguna mutación hereditaria conocida. De ellos, el 85% surgen por inestabilidad cromosómica y un 15% por inestabilidad de microsátélites²⁶.

La inestabilidad cromosómica se origina con la segregación anormal de cromosomas y ocasiona aneuploidía. Tanto la pérdida de heterocigosidad como mutaciones puntuales en los genes puede producir la pérdida de la función de genes supresores de tumores como el APC (*Adenomatous poliposis coli*) o DCC (*Deleted in colorectal carcinoma*). El acúmulo de alteraciones en genes supresores de tumores conduce a la progresión adenoma-carcinoma (vía

supresora, ver Figura 1). Se cree que la pérdida de la función del gen APC es precoz en esta secuencia, favoreciendo la aparición de nuevas anomalías. Conforme el adenoma aumenta en tamaño y displasia, se van sumando nuevas alteraciones genéticas, como las mutaciones en el oncogén K-RAS o la pérdida de la función de DCC ó DPC4. Uno de los cambios tardíos es la pérdida de la función de p53, que se supone que es el que conduce a la formación del carcinoma.

Figura 1. Mutaciones y cambios histológicos de la secuencia adenoma-carcinoma (adaptado de Matkowskyj)²⁶.



La vía de la inestabilidad de microsatélites se origina en la pérdida de la función de los genes reparadores del ADN. Uno de los sistemas es el llamado *mismatch repair (MMR)*, compuesto por proteínas que detectan alteraciones en el apareamiento de las bases, las escinden y las corrigen. Las mutaciones de los genes que codifican estas proteínas ocasionan un acúmulo de errores en la replicación del ADN, aumentando la probabilidad de que alteren genes reguladores del ciclo celular e iniciando o promoviendo la carcinogénesis. Los defectos en este sistema de reparación del ADN se identifican por un aumento de presencia de inestabilidad de microsatélites. Al igual que en los genes supresores de tumores debe existir una alteración (mutación, pérdida del alelo o metilación) en ambos alelos para que se manifiesten.

Los microsatélites son pequeñas secuencias de bases del ADN que no codifican genes y que se repiten un número determinado de veces que depende del alelo o del individuo. Estos microsatélites se ven muy afectados por las mutaciones del sistema MMR, acumulándose los errores en los microsatélites que serán diferentes en el tumor y el tejido normal. Es lo que se llama inestabilidad de microsatélites (IMS) y se detecta en el 15% de los CCR esporádicos y en un 95% de los hereditarios no asociado a poliposis. Los tumores con IMS tienen mejor pronóstico, aunque responden menos a la quimioterapia³¹⁻³³.

Los genes de reparación del sistema MMR más conocidos son MSH2, MLH1, MSH6, PMS1, PMS2, MSH3 y MYH.

Existe una vía alternativa a la secuencia adenoma-carcinoma para el desarrollo del CCR, probablemente secundaria, que es la de los pólipos serrados (Figura 2). Se desarrolla desde los pólipos hiperplásicos a través de los adenomas serrados hasta el adenocarcinoma. Estos tumores tienen defectuosa la vía de reparación del ADN, con inestabilidad de microsatélites. Además, se caracterizan por la presencia de mutaciones en el gen BRAF y sólo raramente con mutaciones K-RAS³⁴⁻³⁶.

Figura 2. Secuencia de mutaciones en la vía pólipo serrado-carcinoma (adaptado de Matkowskyj)²⁶.



3. Síndromes de CCR hereditario

3.1 Síndromes de poliposis

Poliposis adenomatosa familiar (PAF)

Supone de un 1 a un 2% de todos los CCR y se asocia al gen APC (*adenomatous polyposis coli*)³⁷. La PAF se manifiesta primariamente como múltiples pólipos (más de cien) en cualquier localización del tracto intestinal y de tamaño variable. La degeneración carcinomatosa de una o más de estas formaciones se considera inevitable si se deja a la enfermedad seguir su evolución natural. Se asocia a manifestaciones extracolónicas, tales como pólipos gástricos, duodenales e intestinales, osteomas, tumores desmoides, quistes epidermoides, tumores del sistema nervioso central, fibromatosis difusa, hipertrofia del epitelio pigmentario de la retina y tumores malignos. Existe una forma atenuada de PAF caracterizada por menor formación de pólipos y con menor riesgo de desarrollar CCR.

La PAF es un trastorno autosómico dominante con una penetrancia cercana a un 100%. En un 80% de los casos la mutación es heredada y en un 20% es *de novo*, es decir, que éstos últimos no tendrán historia familiar de poliposis.

El gen APC se localiza en el cromosoma 5q21 y contiene 19 exones. La proteína que codifica tiene múltiples dominios y participa en varias funciones celulares: adhesión,

estabilidad del citoesqueleto microtubular, apoptosis y regulación del ciclo celular³⁸. Se han descrito más de 1000 mutaciones distintas del gen APC, que conducen a la producción de una proteína anómala alterándose la degradación de la B-catenina. Al aumentar los niveles de la β -catenina en el citoplasma y núcleo celular, se producen cambios en la regulación de la vía de señalización de WNT-APC- β -CATENINA induciendo cambios en la expresión de múltiples dianas de WNT, entre ellos c-MYC³⁹.

Los cánceres invasores en pacientes con síndrome de PAF aparecen a una edad media de 42 años.

Poliposis atenuada asociada al gen MYH (o MUTYH)

MUTYH es un gen implicado en la reparación del daño oxidativo del ADN. La mutaciones bialélicas ocasionan un cuadro clínico denominado MAP en la literatura inglesa (por *MUTYH-Associated Poliposis*) que es similar a PAF atenuada, con 20-100 pólipos en el colon, de predominio proximal y en ocasiones manifestaciones extracolónicas. Actualmente, se sabe que producen también otros cuadros clínicos como cáncer colorrectal no polipósico o incluso manifestaciones por la vía de los pólipos serrados/hiperplásicos. Sigue un patrón hereditario autosómico recesivo³⁷.

Síndrome de tumor hamartomatoso PTEN

Este síndrome incluye los pacientes clásicamente diagnosticados de síndrome de Cowden y de síndrome de poliposis hamartomatosa. La poliposis hamartomatosa afecta fundamentalmente a la población pediátrica y a la adolescente, mientras que el síndrome de Cowden es más frecuente en adultos. Se transmiten con herencia autosómica dominante con alta penetrancia (un 80%). Ambos están causados por una mutación en la línea germinal del gen PTEN, que se localiza en el cromosoma 10q23.3 y ambos son raros.

Contrariamente a lo que se creía, estudios recientes demuestran un mayor riesgo de cáncer colorrectal, de tiroides, mama, endometrio, riñón y melanoma^{40, 41}.

Síndrome de Peutz-Jeghers

Se trasmite con herencia autosómica dominante y asocia pigmentación mucocutánea y poliposis gastrointestinal, con pólipos de gran tamaño, pero escaso número. Tienen un riesgo alto de desarrollar cáncer colorrectal (un 50% de riesgo acumulado), o en otras localizaciones (riesgo acumulado del 85%) como gástrico, intestino delgado, páncreas, mama, ovario, pulmón, cérvix, útero y testículo.

La mutación responsable se encuentra en el cromosoma 19p13.3 y afecta a un gen que codifica la serina treonina quinasa (STK-11), proteína que participa en la regulación del ciclo celular, apoptosis, etc³⁷.

Poliposis juvenil

Se caracteriza por la existencia de pólipos generalmente limitados al colon, si bien se han descrito casos a nivel gástrico y de intestino delgado, asociados a un aumento de riesgo de cáncer colorrectal. Se asocia a mutaciones en la línea germinal de ENG, SMAD4 y BMPR1, que se heredan con patrón autosómico dominante³⁷.

3.2 CCR hereditario no polipósico (HNPCC) o síndrome de Lynch

Descrito por Lynch en 1966, es la forma más común de cáncer de colon hereditario (2-4% de todos los casos) siguiendo un modo de herencia autosómico dominante con una penetrancia aproximada del 80%³⁷. El CCR hereditario no polipósico (HNPCC, *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) se asocia a mutaciones en los genes de reparación del ADN, fundamentalmente MLH1, MSH2 y MSH6. Los errores de replicación pueden ocurrir de forma espontánea o por la exposición a un agente exógeno. A diferencia de los pacientes con PAF, los que tienen HNPCC no presentan mutaciones para el gen APC por lo que no desarrollan poliposis extensas, haciendo más difícil su identificación. Presentan pólipos con una frecuencia similar a la población normal. Sin embargo, una vez desarrollado éste la progresión a cáncer es mucho más rápida debido a esos defectos genéticos hereditarios de la reparación del ADN.

De acuerdo con los criterios internacionales de diagnóstico (Criterios de Amsterdam I)⁴² al menos tres familiares cercanos de dos generaciones sucesivas deben estar afectados por esta patología, siendo la edad de diagnóstico menor de 50 años en al menos uno de los casos. No obstante, estos criterios presentan limitaciones por el hecho de que estos pacientes, además de presentar CCR, a menudo se ven afectados por otros tumores extracolónicos. Por este motivo, los criterios diagnósticos fueron revisados para contemplar la presencia de estos otros tipos de cáncer (Criterios de Amsterdam II) (Tabla 1)⁴³. Actualmente los más utilizados son los de Bethesda⁴⁴ (Tabla 2).

3.3 Cáncer Familiar Colorrectal tipo X

Fue descrito por Lindor en 2005, incluyendo familias que cumplían los criterios Amsterdam I de HNPCC, pero con tumores con estabilidad de microsatélites. Tienen aumentado el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, pero no tanto como los pacientes con inestabilidad de microsatélites y no tienen mayor riesgo de otros cánceres. Sigue un patrón de herencia autosómico dominante, aunque la base genética no está todavía aclarada. Parece que pueden tener mayor heterogenicidad genética que el síndrome de Lynch³⁷.

Tabla 1. Criterios de Amsterdam para el diagnóstico de síndrome de Lynch.

Criterios de Amsterdam I/II
Mínimo de 3 individuos con cáncer colorrectal o tumor asociado a CCHNP*.
<ul style="list-style-type: none"> • Uno de los familiares es de primer grado.
<ul style="list-style-type: none"> • Mínimo de dos generaciones consecutivas afectadas.
<ul style="list-style-type: none"> • Mínimo de un caso diagnosticado antes de los 50 años de edad.
<ul style="list-style-type: none"> • Exclusión del diagnóstico de poliposis adenomatosa familiar.
* Tumores asociados a HNPCC: colorrectal, endometrio, gástrico, ovario, páncreas, uréter y pelvis renal, vía biliar, glioblastoma, adenomas sebáceos y queratoacantomas.

Tabla 2. Criterios de Bethesda para el diagnóstico del síndrome de Lynch.

Criterios de Bethesda revisados
Cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.
Presencia de CCR sincrónico o metacrónico, o de CCR y un tumor asociado a HNPCC, a cualquier edad.
CCR con histología* de tumor de IMS alta, diagnosticado antes de los 60 años.
CCR y uno o más familiares de primer grado con un tumor asociado a HNPCC diagnosticado antes de los 50 años.
CCR y dos o más familiares de primer y segundo grado con un tumor asociado a HNPCC a cualquier edad.
Debe de cumplirse uno de los criterios
* Presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, reacción Crohn-like, diferenciación mucinosa, anillo de sello o medular.

3.4 CCR familiar

Se estima que un 20-30% de los CCR son compatibles con una predisposición genética de manera independiente a los síndromes conocidos⁴⁵. La identificación de otros posibles genes implicados tendría un gran impacto clínico.

4. Diagnóstico y estadificación del CCR

4.1. Cuadro clínico

Los pacientes con CCR pueden presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas. La presente Tesis Doctoral se realizó en pacientes afectos de cáncer de recto, por lo que se describirá el diagnóstico y estadificación de esta patología, obviando el cáncer de colon a partir de este apartado.

Los síntomas que con mayor frecuencia se asocian son la rectorragia, cambios del hábito intestinal, dolor abdominal, pérdida de peso y síntomas obstructivos. Esta sintomatología, excepto en el caso de la clínica obstructiva, no se correlacionan con el estadio de la enfermedad⁴⁶.

La rectorragia a menudo está mezclada con las heces o puede cubrir la superficie de las mismas. Puede ser de sangre roja brillante independiente de la defecación. Ésta puede valorarse en una persona joven mediante una rectosigmoidoscopia. Todos los demás tipos de hemorragia, incluida la presencia de sangre oculta en heces durante la exploración física rutinaria o la presencia de anemia ferropénica, son indicaciones para la realización de un estudio endoscópico completo.

El tenesmo rectal, la disminución del volumen de las heces, la presencia de moco o la diarrea mucosa (asociada a grandes adenomas vellosos) son bastante frecuentes. Cuando el tumor está avanzado puede inducir una sensación de plenitud constante, tenesmo y un aumento del esfuerzo para la defecación. Cuando el tumor invade sacro y el plexo nervioso sacro, da lugar a dolor pélvico profundo que en ocasiones se irradia a periné y miembros inferiores. Igualmente, puede aparecer dolor anal por invasión del conducto anal o incontinencia por afectación del aparato esfinteriano.

Una detallada anamnesis y una exploración física completa, incluyendo tacto rectal (para valorar la presencia de masas, determinar su localización, movilidad, la presencia de

adenopatías extrarrectales, etc) son imprescindibles. Es esencial la exploración pélvica cuidadosa en las mujeres y la evaluación prostática en los varones.

4.2. Estadificación

La estadificación del cáncer de recto, incluido el estado del margen circunferencial de la fascia mesorrectal, es el mejor indicador pronóstico en pacientes con cáncer de recto⁴⁷. Es crucial a la hora de decidir la necesidad o no de tratamiento neoadyuvante con radioquimioterapia y debe hacerse con extrema diligencia por parte de un equipo multidisciplinar ya que de ella depende el manejo y pronóstico de los pacientes. Si bien, se ha estudiado el posible papel pronóstico de otros factores, patológicos, socioeconómicos, moleculares, etc., éstos no son utilizados de forma rutinaria ya sea por la falta de estandarización, bien por su complejidad o bien por su alto coste económico.

Exploración física

Aparte de la exploración general del paciente, el tacto rectal ha sido, tradicionalmente, el método utilizado para evaluar la movilidad y la invasión parietal en un cáncer de recto. York-Mason y cols.⁴⁸ propusieron una clasificación práctica de estadificación clínica, donde se describían cuatro supuestos:

- Cs I: completamente móvil; no invade la muscular propia.
- Cs II: móvil: invasión de la muscular propia, pero confinado a la pared.
- Cs III: fijo, movilidad anclada: invasión de los tejidos perirrectales.
- Cs IV: fijo, inmóvil: invasión de órganos profundos.

Otro dato a tener en cuenta en la evaluación del cáncer de recto es la valoración subjetiva (escalas clínicas) y objetiva (manometría anal) de la función del esfínter anal del paciente.

Rectoscopia rígida

Una de las primeras exploraciones que se realiza es la rectoscopia rígida. Mediante esta prueba se debe determinar:

- Distancia a margen anal.
- Posición anterior/lateral/posterior.
- Tamaño.
- Configuración morfológica.
- Extensión de la afectación circunferencial.

Si los pacientes no están obstruidos, deben someterse a una colonoscopia a fin de descartar la existencia de tumores sincrónicos, lo cual ocurre entre un 2% y un 9% de los casos.

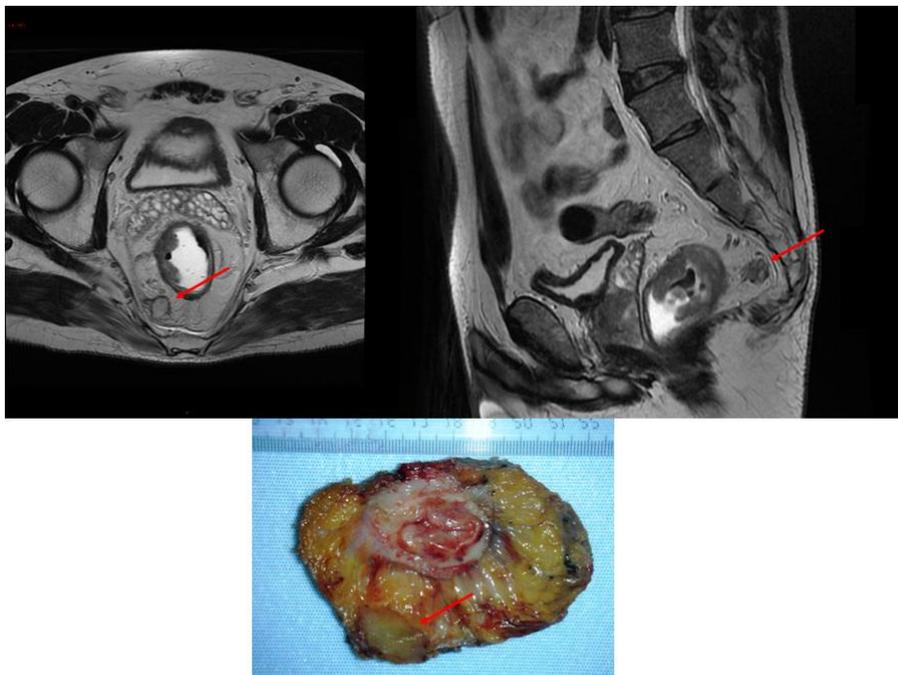
Pruebas de imagen

Las pruebas de imagen más utilizadas para la estadificación preoperatoria de la enfermedad localizada son la ecografía endorrectal y la resonancia magnética pélvica.

La ecografía endorrectal se considera el método ideal en estadios iniciales de la enfermedad, con una sensibilidad y especificidad en torno al 94 y 84% (algo menor en los tumores T3). En estadios avanzados o si hay inflamación puede inducir a supra-estadificación. Una de sus limitaciones es que es operador dependiente y otra es la baja sensibilidad y especificidad para diagnosticar la invasión ganglionar, del 55 y 78% respectivamente⁴⁹.

La gran ventaja de la resonancia radica, sin embargo, en poder estudiar tumores estenosantes donde la sonda endorrectal no es posible de emplazar, además de ser la única que informa sobre el margen circunferencial (Figura 3), detalle de capital importancia en la planificación terapéutica multidisciplinar de los tumores localmente avanzados⁵⁰.

Figura 3. Imagen de estadificación del CCR mediante RMN. Se aprecia perfectamente el margen circunferencial y una adenopatía próxima (flecha roja). En la parte inferior se ve un corte de la pieza quirúrgica con el detalle de ese mismo ganglio (flecha roja).



En la actualidad se acepta que la ecografía, aunque siempre complementaria, debe reservarse para la evaluación de neoplasias precoces (T1 y T2), siendo la resonancia el estándar en los estadios localmente avanzados (T3 y T4)⁵¹.

En la detección de enfermedad metastásica a distancia son de utilidad la tomografía computarizada (TC) y la tomografía por emisión de positrones (PET). La tomografía computarizada tóraco-abdominal con contraste se recomienda en todos los pacientes con cáncer rectal, en concreto es superior a todas las demás pruebas en el caso concreto de detectar posibles metastasis de localización hepática. La PET tiene la limitación de no estar disponible en todos los centros hospitalarios, siendo su principal ventaja el poder rastrear todo el cuerpo del paciente, detectando lesiones de localización extrahepática, pero ofreciendo también demasiados falsos positivos⁵². La radiología simple de tórax es una técnica útil y económica para la detección de lesiones pulmonares así como la ecografía abdominal para el despistaje de las de localización hepática.

La ¹⁸F-FDG-PET ha demostrado ser útil en la detección de afectación metastásica⁵³, sin embargo es reservada para seguimiento y detección de recidiva en enfermos de alto riesgo, más que para el estadiaje inicial. Entre sus limitaciones cuentan la detección de lesiones de pequeño tamaño hepáticas o rectales, subcentimétricas, o de lesiones necróticas con sólo un anillo delgado de tejido viable⁵⁴. También ha demostrado una baja sensibilidad en la detección de carcinoma mucinoso (58%), en comparación con las lesiones no mucinosas (92%), probablemente debido a una relativa hipocelularidad. Otra causa de falsos negativos es la actividad fisiológica del trazador a nivel colorrectal, que en ocasiones puede enmascarar lesiones subyacentes. Los resultados falsos positivos ocurren hasta en un 4% de los casos y pueden deberse a la dificultad en diferenciar la captación normal en tracto gastrointestinal con una lesión maligna y al incremento de captación de ¹⁸F-FDG en los adenomas colónicos, considerados como lesiones premalignas. Se ha descrito que alrededor del 90% de los adenomas con tamaño superior a 1,3 cm captan ¹⁸F-FDG⁵⁵.

El uso combinado de ¹⁸F-FDG-PET/TC mejora la localización y caracterización de las lesiones, así en un estudio de Cohade y col.⁵⁶ estos autores concluyen en que se eleva la exactitud en la estadificación de un 78 a un 89%.

Antígeno carcinoembrionario

La determinación de las concentraciones de antígeno carcinoembrionario (CEA) puede ser útil junto con pruebas de imagen para afinar la precisión de la evaluación preoperatoria. Hasta un 95% de los pacientes que presentan metástasis hepáticas tienen niveles de CEA por encima de 20 ng/mL. Además es útil si se plantea un control postoperatorio del CEA, no

beneficiándose de esta posibilidad aquellos pacientes con niveles de CEA preoperatorios normales.

Clasificación por estadios (TNM)

La estadificación clínico-patológica del cáncer de recto debe realizarse utilizando el actual sistema de clasificación por estadios (TNM) del American Joint Committee on Cancer (AJCC) y Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC)⁵⁷ (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Clasificación del tumor según TNM de AJCC/UICC: invasión del tumor primario (T), de los ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis a distancia (M).

Tumor primario (T)
Tx: el tumor primario no puede ser valorado.
T0: no hay signos de tumor primario.
Tis carcinoma <i>in situ</i> : Incluye las células cancerosas limitadas a la membrana basal glandular (intraepitelial) o lámina propia (intramucosa) sin extensión a la muscular de la mucosa hasta la submucosa.
T1: el tumor invade la submucosa.
T2: el tumor invade la muscular propia.
T3: el tumor invade a través de la muscular propia hasta la subserosa, o hasta tejidos pericólicos o perirrectales no peritoneales.
T4: el tumor invade directamente otros órganos o estructuras o perfora el peritoneo visceral. T4a: perfora el peritoneo visceral T4b: invade directamente otros órganos o estructuras.
Ganglios linfáticos regionales (N)
Nx: los ganglios regionales no pueden ser valorados.
N0: ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales.
N1: metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales. N1a: 1 ganglio. N1b: 2-3 ganglios. N1c: satélites en subserosa sin ganglios regionales.
N2: metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales. N2a: 4-6 ganglios. N2b: 7 o más ganglios.
Metástasis a distancia (M)
Mx: las metástasis no pueden ser valoradas.
M0: no existen metástasis a distancia.
M1: metástasis a distancia. M1a: metástasis en un órgano. M1b: metástasis en más de un órgano o en peritoneo.

Tabla 4. Clasificación por estadios del cáncer de recto según AJCC/UICC.

ESTADIOS			
Estadio I	T1-T2 N0 M0	Estadio III	Cualquier T N1-2 M0
Estadio II	T3-T4 N0 M0	Estadio IIIA	T1-T2 N1 T1N2a
Estadio IIA	T3N0		
Estadio IIB	T4aN0		
Estadio IIC	T4bN0	Estadio IIIB	T3-T4aN1 T2-T3 N2a T1-T2 N2b
		Estadio IIIC	T4a N2a T3-T4a N2b T4b N1-N2
		Estadio IV	Cualquier T, cualquier N M1
		Estadio IVA	Cualquier T ó N M1a
		Estadio IVB	Cualquier T ó N M1b

4.3. Diagnóstico histopatológico

Las neoplasias rectales más frecuentes son los adenomas y los adenocarcinomas. Otros tumores malignos más raros son los linfomas, los sarcomas, los melanomas, los carcinomas de células pequeñas y carcinoides.

Pólipos

Los pólipos rectales se clasifican como hiperplásicos o adenomatosos. Los tipos histológicos de los pólipos adenomatosos son tubular, vellosa (> 50% de componente vellosa) y tubulovellosa (20%-25% al 50% de componente vellosa). Los niveles de invasión⁵⁸ se utilizan para determinar el nivel de infiltración de un carcinoma en un adenoma. Se basan en la morfología macroscópica del adenoma (pediculado, sesil, plano o deprimido) y en el nivel de invasión profunda del carcinoma. En un adenoma pediculado se distinguen niveles Haggitt 0, 1, 2, 3, 4. En un adenoma sesil, plano o deprimido, sólo son posibles los niveles 0 y 4 (Tabla 5).

Tabla 5. Niveles de invasión profunda del carcinoma: *Niveles de Haggitt*.

Carcinoma no invasor
Nivel 0: carcinoma confinado en la mucosa del citópólipo (displasia de alto grado, carcinoma in situ, carcinoma intramucoso).
Carcinoma invasor precoz
Nivel 1: invasión de la cabeza del pólipo (submucosa de la cabeza del pólipo invadida).
Nivel 2: invasión del cuello del pólipo (submucosa del cuello del pólipo invadida).
Nivel 3: invasión del tallo del pólipo (submucosa del tallo del pólipo invadida).
Carcinoma invasor
Nivel 4: invasión de la submucosa de la pared colónica.
Nivel desconocido: en algunos pólipos no resulta posible aislar la base de resección quirúrgica. Puede establecerse el diagnóstico histopatológico de invasión de la submucosa pero no es posible valorar la profundidad de la invasión, es decir, se desconoce si está o no infiltrada la pared colónica.

Carcinoma

Más de un 95% de las neoplasias malignas colorrectales son adenocarcinomas. La clasificación, dependiendo de sus características histológicas, se puede ver en la Tabla 6.

Los grados de diferenciación histológica del adenocarcinoma son: bien diferenciado (G1; > 95% del tumor forma glándulas), moderadamente diferenciado (G2; 50-95% del tumor forma glándulas) y pobremente diferenciado (G3; < 50% del tumor forma glándulas), si bien en la actualidad se tiende a clasificarlos en bien o pobremente diferenciados.

Tabla 6. Clasificación histológica de los tumores de recto.

Adenocarcinoma (común)
Se refiere a la forma habitual de la neoplasia maligna del epitelio glandular colónico.
Adenocarcinoma mucinoso (= coloide)
Más del 50% de la lesión está formada por lagos de mucina extracelular, que contienen epitelio maligno formando acinos, tiras epiteliales o células sueltas. Se asocia con frecuencia a inestabilidad de microsatélites.
Adenocarcinoma de células en anillo de sello
Más del 50% de las células neoplásicas muestran abundante mucina intracelular (células “en anillo de sello”) independientemente de que pueda también haber lagos de mucina extracelular. Algunos muestran inestabilidad de microsatélites.
Carcinoma adenoescamoso
Posee características de carcinoma epidermoide y de adenocarcinoma, bien en áreas separadas del mismo tumor o bien entremezcladas. Se requiere más de un foco ocasional de diferenciación escamosa.
Carcinoma medular
Se caracteriza por una sábana de células malignas con núcleo vesicular, nucleolo prominente y citoplasma eosinófilo abundante, rodeadas por un infiltrado linfocitario intenso. Es una variante rara que se asocia invariablemente a inestabilidad de microsatélites y que tiene mejor pronóstico que el carcinoma pobremente diferenciado e indiferenciado.
Carcinoma indiferenciado
Tumor maligno epitelial sin ninguna evidencia de diferenciación más allá de la propiamente epitelial (sin diferenciación glandular, escamosa, ni neuroendocrina). Estos tumores son genéticamente distintos y se asocian típicamente con inestabilidad de microsatélites.

5. Tratamiento del cáncer de recto

5.1. Tratamiento quirúrgico del cáncer rectal

La cirugía es la base fundamental para el tratamiento curativo. Su objetivo es la extirpación del tumor primario y cualquier diseminación loco-regional que haya podido producirse, sin provocar contaminación tumoral y con la mejor calidad de vida para el paciente.

Estadio I

En fases iniciales del cáncer rectal, T1 sin evidencia de afectación ganglionar, un abordaje local puede ser suficiente para el control del tumor primario, evitando la morbilidad asociada a resecciones más amplias. Los beneficios potenciales de la resección local para el cáncer rectal comprenden una reducción de las complicaciones perioperatorias y la conservación de la función anorrectal, vesical y sexual.

La resección transanal es la técnica más empleada y una opción adecuada para tumores T1 sin evidencia de enfermedad ganglionar⁵⁹. Sin embargo, este tipo de resección no permite conocer la posible afectación ganglionar, siendo el riesgo de afectación ganglionar de un 0-12% en tumores T1 (12-28% en tumores T2)^{60, 61}. Por este motivo, es crítica una adecuada estadificación preoperatoria para la selección de los pacientes. Para reducir el riesgo de recidiva loco-regional, la escisión local sólo debe llevarse a cabo cuando se cumplan los siguientes criterios de esa neoplasia pT1:

- Menores de 3 cm.
- Afecten a menos del 40% de la circunferencia de la pared rectal.
- Grado histológico moderadamente o bien diferenciado.
- No evidencia de invasión venosa o linfática.

Muchos investigadores creen útil la administración de radioterapia pélvica concomitante con quimioterapia de manera adyuvante en pacientes con tumores T2 sometidos a escisión local y en pacientes con tumores T1, que llevan asociados factores de mal pronóstico como invasión linfovascular, histología pobremente diferenciada, etc., para disminuir el riesgo de recurrencia locorregional^{62, 63}. La alternativa a esto siempre debe de ser el rescate quirúrgico con cirugía radical.

En la actualidad la incorporación indiscutible de técnicas de microcirugía transanal endoscópica ha supuesto un nuevo impulso a la exéresis local del carcinoma de recto en estadios precoces^{60, 61, 64}.

Estadios II – III

Los carcinomas que asientan en el tercio medio e inferior del recto se deben intervenir practicando una resección anterior baja (RAB), restableciendo el tránsito mediante anastomosis colorrectal. Cuando se realiza una resección y anastomosis muy próxima al esfínter es conveniente practicar una ileostomía de protección, pues esta técnica tiene un alto índice de dehiscencia anastomótica. Además, se pueden producir secuelas como la urgencia y frecuencia defecatoria, por lo que se pueden asociar reservorios cólicos o plastias. En pacientes con incontinencia previa estaría indicada la intervención de Hartmann. En los casos

en que no se pueda mantener un margen de tejido sano distal al tumor de al menos 0,5-1 cm⁶⁵ entre éste y el esfínter anal, se debe realizar una amputación abdómino-perineal. Los del tercio superior se deben tratar mediante resección anterior de recto, seccionando el mesorrecto de forma parcial.

En resumen, el objetivo del tratamiento quirúrgico del cáncer de recto localmente avanzado es la resección del tumor con unos márgenes adecuados, así como la resección de los ganglios de drenaje del tumor, incluyendo el concepto de escisión completa del mesorrecto (TME). Se trata de la técnica quirúrgica radical de elección independientemente de que sea continente, (RAB y resección interesfínterica) o se trate de la amputación abdómino-perineal. La mortalidad es de un 1-7% y la morbilidad de un 13-46%. La recidiva local se observa entre un 4 y un 10% de los pacientes y la supervivencia está entre un 74 y un 87%⁶⁴.

Numerosos estudios han demostrado los beneficios de la escisión completa del mesorrecto y determinan que sea hoy en día un procedimiento estándar en el manejo de tumores rectales localizados en recto medio e inferior⁶⁶. Todo esto permite una adecuada estadificación de la enfermedad y una disminución del riesgo de recurrencia locoregional y de la diseminación.

La capacidad de obtener un margen circunferencial negativo se asocia a un menor riesgo de recurrencia local^{67,68}. Un estudio prospectivo revela una recurrencia local del 7% tras la adición de TME en comparación con un 23% en los controles históricos. Realizar cirugía de conservación esfínteriana depende de los requerimientos de un margen distal de 1 cm en lugar del margen tradicional de 5 cm⁶⁹⁻⁷¹. Un estudio publicado en 2012⁶⁵ no encontró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a supervivencia o recidiva local en pacientes con menos de 1 cm de margen distal en pacientes sometidos a una resección anterior baja con escisión mesorrectal completa. Incluso apuntó la posibilidad de que un margen de 5 mm pudiera ser aceptable en pacientes y tumores seleccionados.

La disección de los ganglios linfáticos debe extenderse inmediatamente distal al origen de la arteria cólica izquierda.

5.2. Tratamiento neoadyuvante

Radioterapia

La radioterapia externa en el cáncer de recto comenzó a aplicarse a principios del siglo pasado. Antes de la Segunda Guerra Mundial, en Alemania, escaseaba el radio, condicionando el uso de radioterapia externa para el tratamiento del cáncer de cérvix en vez de la

radioterapia intracavitaria. A raíz de esto, Chaoul comenzó en Berlín a aplicar radioterapia externa en casos de cáncer de recto inoperables, demostrando que altas dosis de radiación de baja energía eran seguros cuando se aplicaban directamente en el tumor⁷². En 1946, Lamargue y cols, demostraron que la radioterapia a dosis de 50Kv podía conseguir un buen control local de la enfermedad y una supervivencia del 42% a 5 años⁷³. Esta técnica fue popularizada por Papillon, quien entre 1950 y 1990 trató más de 300 pacientes y publicó unos resultados con un 75% de supervivencia global a los 5 años y sólo un 9% de recidivas locales⁷⁴. Estudios posteriores, entre 1980 y 1990, confirmaron que se podía mejorar la supervivencia y disminuir las recidivas locales con la administración de radioterapia postoperatoria, generalizándose su uso en los estadios avanzados (II y III)⁷⁵.

En el año 2001 Kapiteijn demostró que la radioterapia preoperatoria, consistente en 5 fracciones de 5 Gy, disminuía las recidivas locales de un 8,2% a un 2,4%⁷⁰. Posteriormente, el grupo alemán para el estudio del cáncer de recto publicó la superioridad de la radioquimioterapia aplicada de forma preoperatoria respecto a la postoperatoria en términos de recidiva local y de tasa de preservación de esfínteres⁷¹. La efectividad de la radioterapia para disminuir la recidiva local se basa en su capacidad de reducir la masa tumoral y/o esterilizar la afectación ganglionar, ambas responsables de un margen circunferencial afecto pese a una técnica quirúrgica depurada en los tumores localmente avanzados⁷⁶. No obstante, y pese a estos resultados a nivel local, las tasas de recidiva en forma de metástasis a distancia permanecen estables en torno a un 30-35%, lo mismo que la supervivencia libre de enfermedad (50-55%) y la supervivencia global a los 5 años (65%)⁷⁷. La optimización multidisciplinar de la estrategia neoadyuvante (antes de la cirugía), de inducción (antes de la radioterapia) y de consolidación (después de la radioterapia pero antes de la cirugía) están todavía siendo sometidas a amplia discusión y estudio⁷⁸.

La radioterapia provoca alteraciones en el ADN de las células, especialmente aquellas con un alto índice mitótico como son las tumorales, inhibiendo la proliferación y crecimiento celular e induciendo apoptosis.

En la actualidad, estos dos esquemas siguen en plena vigencia y están validados con alto grado de evidencia:

- Ciclo corto o esquema sueco: 25 Gy totales en fracciones de 5 Gy durante 5 días, seguido de cirugía a la semana⁷⁰.

- Ciclo largo: radioterapia a dosis de 45-50,4 Gy, administrada en 28 fracciones de 1,8 Gy al día y en asociación con quimioterápicos basados en el 5-fluorouracilo (5FU), seguida de cirugía tras un intervalo de 4 a 12 semanas⁷¹.

El ciclo largo, al tener un intervalo más largo hasta la cirugía, permite un efecto a largo plazo de la radioterapia y una posible disminución del tamaño tumoral aumentando las posibilidades de resección R0. Sería, por tanto, más efectiva en los casos de margen circunferencial afecto o amenazado.

Un reciente estudio de la Cochrane⁷⁹ demuestra la superioridad de la asociación entre radio y quimioterapia frente a radioterapia sola en cuanto a respuesta patológica completa y recidivas locales, pero a costa de una mayor toxicidad. Existen varios estudios en marcha que pretenden acabar de establecer la mejor pauta de neoadyuvancia, comparando la radioterapia de ciclo corto 25 Gy con cirugía a la semana, la misma radioterapia seguida de cirugía a las 4-6 semanas y la radioquimioterapia (RQT) de ciclo largo seguida de cirugía en 4-6 semana (estudio escandinavo fase III)⁸⁰ o comparando la radioterapia de ciclo corto 25 Gy con cirugía inmediata frente a la radioquimioterapia de ciclo largo seguida de cirugía en 4-6 semanas (estudio alemán en fase III)⁸¹. Los primeros resultados del estudio escandinavo reflejan que la radioterapia de ciclo corto seguida de cirugía de intervalo es factible, tiene menos complicaciones postoperatorias que la radioterapia de ciclo corto con cirugía inmediata y se beneficia de un efecto reductor de tamaño tumoral⁸². Las complicaciones y la cifra de leucocitos postoperatorias son peores en los pacientes que han recibido ciclo corto con cirugía inmediata que en los otros dos grupos⁸³.

De cara a la planificación multidisciplinar de la radioterapia y como cirujanos es importante tener en cuenta tanto el riesgo de recidiva local como las causas o localización de estas posibles recidivas⁸⁴.

El riesgo de recidiva local está aumentado en las circunstancias que comprometen el margen circunferencial, especialmente en los tumores que sobrepasan la pared rectal (T3-T4), localización baja que implica amputación abdómino-perineal, afectación ganglionar (sobre todo N2), e importante extensión tumoral dentro del mesorrecto. Atendiendo a estas características, se pueden definir dos grupos de riesgo de padecer una recidiva local basándonos en la estadificación preoperatoria local que nos ofrecen las pruebas de imagen (resonancia magnética y ecografía endorrectal):

- Grupo de alto riesgo: tumores T3b (extensión dentro del mesorrecto menor de 5 mm), N+, o todos aquellos T3 que requieren amputación abdómino-perineal.
- Grupo de riesgo muy elevado: tumores T3c (extensión dentro del mesorrecto mayor de 5mm) o T4 con margen circunferencial afecto.

No obstante, la radioquimioterapia no está exenta de toxicidad y se asocia a un mayor índice de complicaciones postoperatorias⁸⁵; por ello en los llamados tumores T3 mínimos (T3a)

en los que una técnica quirúrgica correcta puede conseguir un margen circunferencial adecuado está en profundo debate el empleo de neoadyuvancia⁸⁶.

Las causas de recidiva local se deben a la persistencia de células tumorales o a la posible diseminación peroperatoria por exéresis incompleta del mesorrecto, por invasión ganglionar látero-pélvica no conocida y no tratada, o por exéresis incompleta de las fosas isquiorrectales en la amputación abdómino-perineal. En este último caso, hay que tener en cuenta que entre un 10 y un 15% de los tumores T2 de recto bajo pueden tener margen infiltrado. Las nuevas técnicas de amputación (resección cilíndrica) lo minimizan⁸⁷. Se acepta que la exéresis incompleta del mesorrecto es la causa más frecuente de recidiva local. Puede ser intencionada (en las resecciones anteriores altas) o accidental debida a la disección por dentro de la fascia del mesorrecto, o una resección insuficiente por debajo y atrás o bien hacia delante por una disección posterior a la fascia de Denonvilliers. Un margen distal afecto es hoy en día una causa rara de recidiva, puesto que se acepta que con 5-10 mm es suficiente. Además se han incorporado técnicas como la resección interesfintérica para garantizar este margen.

Las localizaciones más frecuentes de recidiva local son: presacras medias en la parte inferior de la pelvis (50%), perianastomóticas (20%), anteriores con invasión de órganos génito-urinarios (15%), pósterolaterales a nivel de la escotadura sacrociática (20%), perineales en amputaciones abdómino-perineales (10%). En el 15% de los pacientes se observa más de una localización.

La radioterapia debe cubrir un campo que incluya el volumen tumoral macroscópico, así como posibles adenopatías⁸⁴:

- De las cadenas ilíacas internas por debajo de la bifurcación de la arteria ilíaca común en el caso de tumores altos.
- De las cadenas látero-pélvicas si hay afectación ganglionar o el tumor está por debajo de los 8 cm del margen anal.
- De las fosas isquiorrectales en tumores que van a ser candidatos a amputación abdómino-perineal.

El límite inferior del campo de irradiación debe ser el borde superior de los elevadores del ano sin incluirlos, a excepción de tumores bajos subsidiarios de resección abdómino-perineal.

La toxicidad tardía de la radioterapia es el mayor factor limitante. Existen varios estudios en marcha que tratan de optimizar este tratamiento que en un futuro no muy lejano pueden modificar las pautas que se están administrando actualmente⁷⁷, como la radioterapia conformacional con modulación de la intensidad, que trata de disminuir la toxicidad urinaria y

gastrointestinal para los grandes volúmenes de irradiación a la vez que aumenta la dosis en el tumor (técnica de complemento integrado o *simultaneous integrated boost* ó SIB-IMRT). Los resultados del estudio americano RTOG 0822 están todavía pendientes de publicación.

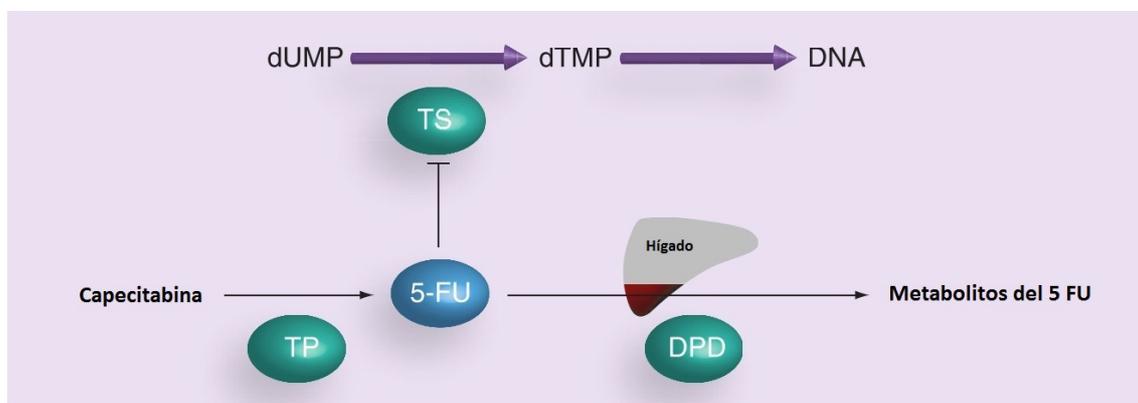
Quimioterapia

No todos los individuos responden igual a la neoadyuvancia. La tasa de respuesta patológica completa en los especímenes quirúrgicos se sitúa en torno a un 20-30%. El resto de los casos se dividen en distintos grados, desde una disminución de la carga tumoral a una ausencia total de respuesta. Para mejorar los efectos de la radioterapia se han asociado tratamientos radiosensibilizantes mediante agentes quimioterápicos.

El 5 fluoruracilo (5FU), es uno de estos fármacos de uso más extendido. Su mecanismo de acción se debe a que se une a la enzima timidilato sintasa, alterando la síntesis de las bases de timina y por tanto del ADN, provocando la muerte celular, especialmente de las células con mayor número de mitosis, como son las cancerígenas.

Otra molécula empleada en la neoadyuvancia es la capecitabina (xeloda®), un carbamato fluoropirimidínico precursor del 5FU y que tiene la ventaja de que se administra por vía oral. La capecitabina (profármaco), por acción de la enzima timidina- fosforilasa, se transforma en 5FU a nivel intracelular. La acción de esta enzima es mayor en células tumorales y se potencia con la irradiación, resultando en un mayor efecto de la capecitabina durante la radioterapia a la vez que disminuyen los efectos en células y tejidos sanos⁸⁸. El 5FU se degrada a nivel hepático mediante la enzima dihidropirimidina dehidrogenasa (Figura 4).

Figura 4. Interacción de la capecitabina y 5FU en la vía metabólica de la timidina. A nivel intracelular la capecitabina se transforma en 5FU por medio de la enzima timidilato fosforilasa (TP). El 5FU inhibe la acción de la timidilato sintasa (TS) y por tanto la síntesis de bases pirimidínicas. El 5FU se degrada en el hígado por acción de la dihidropirimidina deshidrogenasa. (Adaptado de Huerta 2008)⁸⁹.



Dos ensayos clínicos estudiaron las ventajas que podía tener la adición de 5FU al tratamiento radioterápico (EORTC 22921 y FFCD 9203). En ellos se comparaba en un brazo el esquema de 25 Gy en 5 fracciones frente a una pauta de 50 Gy (25 fracciones de 1,8 Gy cada una) asociada a una quimioterapia con 5FU. Se comprobó que no existían diferencias en cuanto al desarrollo de metástasis a distancia ni en la supervivencia global a los 5 años, pero si se encontraron menos recidivas locales en el brazo de añadía quimioterapia^{90,91}.

Hofheinz publicó un ensayo fase III⁹² que comparaba la eficacia de la radioterapia de ciclo largo (50,4 Gy) asociada a 5FU en un brazo y capecitabina en el otro, concluía que este último agente producía más síndrome de mano-pie, más fatiga y más proctitis, aunque menos leucopenia. Las recurrencias fueron similares en ambos grupos, sin embargo aparecieron menos metástasis a distancia en el grupo de la capecitabina. Asimismo, había una mejoría en supervivencia libre de enfermedad a los 3 años y supervivencia global a los 5 años. Además, los pacientes que presentaban más síndrome de mano-pie tenían una supervivencia libre de enfermedad a los 3 años y supervivencia global a los 5 años mejor que los que no lo padecieron.

Recientemente la Cochrane ha publicado un metanálisis⁷⁹ que demuestra que la adición de quimioterapia a la radioterapia preoperatoria aumenta la toxicidad grave (OR 1,68-10, p = 0,002), afectando sólo marginalmente la morbilidad global postoperatoria (OR 0,67-1,00, p = 0,05) pero no a la mortalidad postoperatoria o a las cifras de fuga anastomótica. Además, la pauta combinada de radio y quimioterapia aumentaba la tasa de respuesta patológica completa (OR 2,12-5,84, p < 0,00001), consiguiendo disminuir las recurrencias locales (OR 0,39-0,72, p < 0,001). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a supervivencia libre de enfermedad o supervivencia global. Este estudio parece confirmar así la superioridad de la quimioradioterapia frente a la radioterapia sola.

Actualmente la pauta de neoadyuvancia de uso más extendido y la que se ha empleado con los pacientes de este estudio es la administración de radioterapia a dosis total de 50,4 Gy en 25 fracciones de 1,8 Gy asociada a capecitabina (850 mg/m²).

Optimización de la quimioterapia preoperatoria

Nuevos agentes quimioterápicos

Para tratar de conseguir mejor respuesta se han diseñado estudios que añaden otros quimioterápicos, como el oxaliplatino, irinotecan y anticuerpos monoclonales. La mayoría de estos ensayos se encuentran en fase III sin publicar. En los dos estudios fase III finalizados (francés ACCORD 12/0405 e italiano STAR-01) y pese a algunas deficiencias metodológicas, no se ha podido demostrar una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a porcentaje

de respuesta patológica completa, pero si el hecho de que el oxaliplatino aumenta la toxicidad⁹³.

Quimioterapia de inducción

Basándose en la hipótesis de que una quimioterapia sería mejor tolerada antes de la cirugía o de que podría mejorar las tasas de respuesta patológica completa (RPC) se han diseñado protocolos de quimioterapia de inducción, administrada antes de la radioquimioterapia de ciclo largo⁷⁷. Se supone, que este tipo de esquema implicaría un mejor control sistémico de la enfermedad puesto que es la quimioterapia la única responsable del posible tratamiento de afectación a distancia de la neoplasia primaria. Se evitaría así que una complicación quirúrgica (40% en algunas series para casos de neoplasia de recto tratada con neoadyuvancia) retrasara o anulara la aplicación del protocolo adyuvante basado en quimioterapia.

Se están analizando diversas pautas de quimioterapia de inducción, como la publicada por Schou y cols., que administran capecitabina y oxaliplatino, seguido de radioquimioterapia de ciclo largo con capecitabina y cirugía de intervalo consiguiendo un 23% de respuestas patológicas completas, 63% de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años y 67% de supervivencia global, con un 18% de toxicidad grave⁹⁴. Otro estudio fase II analiza la aplicación de irinotecan y capecitabina seguida de radioquimioterapia con capecitabina y cirugía convencional, concluyendo que es segura y que consigue una buena respuesta⁹⁵.

Intervalo entre neoadyuvancia y cirugía

El intervalo óptimo de tiempo entre la radioquimioterapia y la cirugía resectiva todavía no se ha determinado. Parece haber consenso en que un período más largo conlleva una mayor disminución del tamaño tumoral y mayor índice de RPC.

El ensayo francés Lyon 09-01 comparó un intervalo de tiempo corto (2 semanas) frente a largo (6-8 semanas) tras una radioterapia de 39 Gy en 13 fracciones (una pauta que no se adapta al habitual ciclo corto). Un intervalo de tiempo mayor hasta la cirugía demostró una mayor respuesta patológica y clínica, sin que haya diferencias en cuanto a supervivencia global a los 3 años, recidivas locales o morbi-mortalidad postoperatoria precoz⁹⁶. Aunque no se consiguió demostrar, un intervalo de tiempo más largo, al tener mayor tasa de respuestas podría aumentar las posibilidades de margen circunferencial libre o de preservación de esfínteres.

No hay evidencia científica que avale un ciclo de radioterapia corto con un intervalo de tiempo prolongado. Existe un ensayo clínico en marcha, Stockholm III que compara diferentes

pautas: radioterapia 5x5 Gy con cirugía inmediata, 5x5 Gy con cirugía después de un intervalo de 4-6 semanas y 25x2 Gy con cirugía tras el mismo intervalo. Los primeros resultados parecen decantarse por la cirugía tras intervalo tanto para el ciclo largo como para el corto^{82, 83}.

Toxicidad de la neoadyuvancia

Si bien el tratamiento neoadyuvante proporciona importantes beneficios en cuanto a control local y de supervivencia en pacientes que muestran respuesta completa y todo esto conduce indudablemente a mejorar la calidad de vida, no está exento de efectos secundarios⁹⁷. Aunque la documentación de estos efectos ha sido mal recogida en la mayoría de las publicaciones, se suelen emplear escalas con los diferentes grados de toxicidad observados. Las más frecuentemente utilizadas para evaluar el grado e intensidad durante y después de la irradiación son las establecidas por el Radiation Therapy Oncology Group/European Organization for Research and Treatment of Cancer (RTOG/EORTC) o por el National Cancer Institute (NCI). Ambas establecen la existencia de 5 grados en función de la intensidad de la afectación, siendo el grado 0 la ausencia de efectos secundarios y el IV toxicidad muy grave, que puede desencadenar la muerte.

Toxicidad aguda

Los efectos secundarios durante los 3 primeros meses de la radioterapia de ciclo corto son bien conocidos y bastante frecuentes, observándose entre en un 26% y un 37,5% según las publicaciones^{70, 98}. Los más habituales son los gastrointestinales (en torno a un 13%), aunque la mayoría son de grado leve (I y II). Le siguen los neurológicos, cuya toxicidad más importante es la plexopatía, problema que se redujo hasta desaparecer al mejorar la técnica⁹⁷. No se produce plexopatía si se fracciona la dosis hasta 2 Gy/día, y sólo se ha observado en los ciclos hipofraccionados de 5 Gy durante 5 días.

En lo que respecta a la radioquimioterapia de ciclo largo, esta provoca mayor toxicidad que la de ciclo corto, 54% vs. 37,7% según el estudio EORTC⁹⁸. La capecitabina, como se mencionó anteriormente, provoca mayor número de pacientes con síndrome mano-pie comparado con el 5FU, pero menos leucopenia. Los dos provocan una similar toxicidad gastrointestinal y cutánea. Si se añade oxaliplatino al tratamiento se incrementa de forma significativa los efectos secundarios hasta 2,5-3 veces⁹³.

La administración de 5FU se ha asociado con una incidencia de cardiotoxicidad entre 1,2 y 18%. Suele aparecer de forma precoz durante el tratamiento y es impredecible. De estos pacientes, en un 48% de los casos se manifiesta en forma angina, infarto de miocardio en el 23%, arritmias en 16%, edema agudo de pulmón en el 7% y pericarditis en un 2%⁹⁹.

Complicaciones postoperatorias

Pocas publicaciones recogen las complicaciones postoperatorias⁹⁷. La frecuencia de dehiscencia anastomótica es similar para los dos grupos de pacientes en los estudios individuales, sin embargo estudios poblacionales demuestran que la radioterapia es un factor de riesgo independiente para la dehiscencia de sutura. Se ha demostrado incluso una relación entre la fuga anastomótica y el grado de regresión en la pieza operatoria.

En cuanto a la amputación abdomino perineal hay mayor porcentaje de pacientes con retraso en la cicatrización perineal entre los irradiados, aunque no todos los estudios lo demuestran. Las complicaciones quirúrgicas tras adición de oxaliplatino a la radioquimioterapia de ciclo largo sólo está descrita en un estudio en fase III⁹³, en el cual las tasas de fuga anastomótica fueron iguales con o sin el oxaliplatino.

También las complicaciones cardíacas y psicológicas son mayores en pacientes con radioquimioterapia.

La mortalidad postoperatoria es similar tanto en pacientes en los que se realiza tratamiento neoadyuvante como en los que no, incluso en los estudios donde se añade oxaliplatino.

Toxicidad tardía

El estudio holandés TME en 597 pacientes, describe que no hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a función de la ostomía ni en síntomas directamente relacionados con la cirugía pélvica. Sin embargo hay un gran contraste en la función intestinal y defecatoria en los pacientes que tuvieron una cirugía con escisión mesorrectal total sola frente a los que también recibieron radioterapia de ciclo corto¹⁰⁰. La radioterapia influía negativamente en la calidad de vida de los pacientes. Un 62% de ellos mostraban incontinencia durante el día (cualquier grado) y un 32% durante la noche. Un 14% de los pacientes referían incontinencia diaria en el grupo de los irradiados, frente a un 5% en el de la cirugía aislada¹⁰¹. Este problema era más frecuente en aquellos pacientes con tumores en recto medio, precisamente aquellos que más se benefician de una neoadyuvancia, muchas veces para evitar la necesidad de estomas. Y además esto ocurre a pesar de que los volúmenes de irradiación no incluyen el esfínter anal en esta localización tumoral.

Las deposiciones fraccionadas con sensación de evacuación incompleta se describen en un 35-58% de los casos. Es llamativo el hecho de que los pacientes irradiados sin ostomía estaban significativamente menos satisfechos que los no irradiados. Entre los pacientes portadores de ostomía la satisfacción era similar. Lo cual podría llevar a pensar que la

afectación de la continencia tras la radioterapia es tan significativa y afecta tanto a la vida del paciente que este podría plantearse una ostomía como garante de una mejor calidad en el día a día¹⁰⁰.

Curiosamente, la función urinaria no demuestra diferencias estadísticamente significativas si se usa o no neoadyuvancia, siendo la incontinencia urinaria en torno al 40% en ambos grupos (cualquier grado).

Tanto en hombres como en mujeres se puede ver deteriorada la función sexual siendo más frecuente en el grupo de los pacientes irradiados a los dos años de la cirugía. En las mujeres provoca sequedad vaginal y falta de lubricación, sin embargo ellas no parecen preocuparse mucho por este deterioro en su vida sexual. En los varones, tanto la eyaculación como la erección se ven empeoradas en los pacientes tratados con un ciclo corto afectando esto su calidad de vida⁹⁷.

Las fracturas de cadera se mencionan rara vez como posible toxicidad tardía en las publicaciones. En estudios de gran número de pacientes no parece haber diferencias según hayan recibido o no neoadyuvancia.

5.3 Evaluación de la respuesta a la radioquimioterapia

La sensibilidad de los distintos tumores a la radioquimioterapia varía considerablemente desde la desaparición de células tumorales en la pieza a una ausencia total de respuesta. La primera (respuesta patológica completa) se observa hasta en un 30-40% de los casos y se asocia, con mejores resultados oncológicos (recidiva local y supervivencia) a largo plazo. Por un lado sería deseable detectar ese subgrupo de pacientes sin respuesta donde lo único que se consigue es un retraso del tratamiento y un aumento de la morbilidad. Por otro lado, un diagnóstico acertado de aquellos pacientes que tienen una buena disminución de la carga tumoral podría suponer un cambio en la técnica quirúrgica empleada, especialmente en aquellos pacientes con tumores muy bajos o que previamente eran irresecables. Incluso algunos grupos se preguntan si realmente es necesaria la cirugía radical en aquellos casos con una RPC demostrada donde podría ser suficiente un seguimiento estrecho¹⁰².

Respuesta anatomopatológica (ypTNM) al tratamiento neoadyuvante

En la actualidad la única manera de evaluar de forma fidedigna la respuesta al tratamiento neoadyuvante es el análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica.

El objetivo final de la terapia neoadyuvante es la obtención de una respuesta completa desde el punto de vista patológico (RPC), entendiendo ésta como la ausencia de células tumorales en la pieza quirúrgica. En cuanto a la ausencia de respuesta, se han considerado diferentes grados y clasificaciones:

- Disminución de tamaño de la lesión tumoral (término inglés *downsizing*) es decir, disminución del T.

- Disminución del estadio anatomopatológico ypTNM (término inglés *downstaging*), en función de la disminución en uno o más estadios respecto a la estadificación clínica (cTNM)¹⁰³.

Una limitación reside en la falta de capacidad para determinar los diferentes estratos histológicos afectos, no discriminando entre la respuesta de tumores que se encuentran en el mismo estrato, al no especificar si la afectación residual es mínima o masiva con respecto a la fibrosis observada¹⁰⁴.

- Índice de Regresión Tumoral: TRG.

En un intento de complementar esta información se ha propuesto el empleo de un índice de regresión tumoral (conocido habitualmente por sus siglas en inglés TRG: Tumoral Regresion Grade). Este criterio parte de que el grado de regresión o respuesta tumoral se caracteriza por una serie de cambios citológicos y a nivel del estroma. Desde el punto de vista citológico, las células neoplásicas muestran vacuolización y/o eosinofilia, picnosis nuclear y necrosis. A nivel del estroma, los cambios propios de la regresión son la fibrosis, con o sin infiltrado inflamatorio, incluyendo el granuloma gigantomocelular alrededor de células fantasma y queratina. Estos hallazgos han llevado a diferentes autores a exponer los signos histopatológicos que permitirían la clasificación de dichos grados de respuesta en cinco grupos dependiendo del porcentaje microscópico de fibrosis y de restos tumorales hallados en la pieza^{105, 106}. Mandard y colaboradores describen cinco grados de regresión originalmente en pacientes con cáncer de esófago tratados con neoadyuvancia:

- Grado 1: ausencia de células neoplásicas.
- Grado 2: alguna célula neoplásica con claro predominio de fibrosis.
- Grado 3: células neoplásicas en la pieza, si bien la fibrosis sigue siendo predominante.
- Grado 4: predominio de células neoplásicas sobre el componente fibrótico.
- Grado 5: ausencia de regresión.

En base al mismo concepto teórico, el grupo de Dworak define cuatro grados de regresión en pacientes con cáncer de recto tratados con tratamiento neoadyuvante:

- Grado 0: ausencia de regresión.
- Grado 1: predomina la masa tumoral sobre la fibrosis.
- Grado 2: predomina la fibrosis con algunos grupos celulares tumorales.

- Grado 3: predomina la fibrosis con pocas células tumorales (difíciles de identificar microscópicamente).
- Grado 4: sólo fibrosis. Respuesta total o total regresión.

Pese a que inicialmente los criterios de Dworak pudieran parecer más específicos para su aplicación en el carcinoma colorrectal, la mayoría de los grupos utilizan los criterios de Mandard y son los que se ha seguido en este estudio. Se han clasificando a los pacientes en dos grupos, respondedores (aquellos que muestran grados de regresión I y II) y no respondedores (grados del III al V).

Valoración clínica, metabólica y molecular de la respuesta al tratamiento neoadyuvante

Hasta la fecha no existe una metodología adecuada para evaluar de forma fidedigna la respuesta al tratamiento neoadyuvante antes de la intervención.

Marcadores tumorales

El valor de los niveles de CEA (antígeno carcinoembrionario) pretratamiento es un factor de pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de recto^{107, 108}. También es conocida su validez para el control evolutivo de dichos pacientes y su capacidad de descartar/diagnosticar la presencia de recidivas en base a la alteración de sus niveles en sangre. Varios estudios relacionan los niveles elevados de CEA pretratamiento con una respuesta peor y niveles bajos de CEA con una respuesta patológica completa¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

Los niveles de CEA < 2,61 ng/mL después de la radioquimioterapia también han resultado ser predictores de respuesta patológica completa en el estudio de Yang¹¹¹. En aquellos pacientes que partían de niveles elevados de CEA pre-QRT, tanto el CEA post-QRT como la razón de CEA, resultaron predictores de la respuesta patológica completa. Un resultado similar aporta el estudio de Restivo publicado también en 2013¹¹².

Métodos de imagen y metabólicos

Las técnicas de imagen convencional (ecografía endorrectal, TC y RM) se han confirmado como pruebas indispensables en la estadificación de estos pacientes, sin embargo, no han demostrado ser predictores positivos adecuados de la respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante en pacientes con cáncer de recto¹¹³. La inflamación, la fibrosis, necrosis o el edema que genera la radioterapia provocan artefactos y efecto masa que dificultan la reevaluación en la RM, ecografía endorrectal y la TC pélvica, razones por la cual no son fiables en este aspecto. En muchos casos tienden a sobreestimar la extensión local del tumor después de haber recibido tratamiento.

De la necesidad de estandarizar y unificar los criterios de respuesta al tratamiento en los tumores sólidos surgieron en el año 2000 los criterios RECIST, siglas en inglés de *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*, que son criterios internacionalmente aceptados, usados para comprobar si una terapia funciona y definir si el paciente con cáncer está respondiendo adecuadamente al tratamiento en las pruebas de imagen. Fueron revisados en 2009, cuando se publicó la nueva guía RECIST 1.1, cuyas principales modificaciones son que reduce el número máximo de lesiones diana de 10 a 5 en total (y de 5 a 2 por órgano), incorpora como lesión medible las adenopatías patológicas (eje corto > 15 mm) y aclara el manejo de lesiones óseas y quísticas¹¹⁴.

En un estudio de Rau et al. la ecografía endorrectal demostraba una exactitud en el diagnóstico del 29% entre los pacientes respondedores y del 82% entre los no respondedores. En cuanto al diagnóstico de la afectación ganglionar la exactitud era de un 57%¹¹⁵. Para la TC la capacidad de diagnosticar con exactitud el yT es del 37%, 62% para el yN y un 71% para el margen circunferencial¹¹⁶.

Para la RMN, la exactitud para diagnosticar la respuesta a nivel del T es del 50%, para la invasión ganglionar del 65% y para el margen circunferencial del 65-80%¹¹⁷. Según un metanálisis del 2013, la RMN tiene una sensibilidad y especificidad del 50% y 91%, respectivamente, para la re-estadificación del T, pero se podía mejorar mediante imagen DW y con observadores experimentados¹¹⁸.

Es conocido que la ¹⁸F-FDG-PET tiene una sensibilidad próxima al 100% en la detección de cáncer de recto diagnosticado de novo^{119, 120} y que un alto valor del SUV refleja una mayor agresividad tumoral y un mal pronóstico a largo plazo¹²¹. Por otra parte, la ¹⁸F-FDG-PET, ha demostrado ser superior a las técnicas de imagen convencional en la re-estadificación de pacientes que han recibido tratamiento, mostrando una mayor seguridad en la detección de tumor residual^{122, 123}.

En el cáncer de recto localmente avanzado tratado con neoadyuvancia los resultados publicados por los distintos grupos de trabajo son discordantes, la mayoría de los estudios reportan niveles de SUV (*Standard Uptake Value*) postratamiento menores que antes de iniciarlo, pero estos valores postratamiento no han demostrado una buena correlación con la respuesta patológica completa siendo la sensibilidad para detectarla de un 63%, la especificidad de un 74% y la exactitud de un 74% en nuestro centro¹²⁴. El índice de regresión (porcentaje de reducción del SUV después del tratamiento con respecto al valor inicial) tampoco ha demostrado capacidad de predicción de la respuesta patológica. Los cambios en el metabolismo local inducidos por el tratamiento con radio y quimioterapia neoadyuvante

pueden ser la causa de este bajo rendimiento diagnóstico de la ^{18}F -FDG-PET tras la neoadyuvancia¹²⁵.

6. Aplicación de los microarrays

6.1. Introducción

En 1977 Fred Sanger y Alan R. Coulson publicaron una metodología para la secuenciación de cadenas de ADN que supuso una revolución en la investigación en biomedicina, al sentar las bases que permitirían secuenciar genes y, posteriormente, genomas completos¹²⁶. Una década después, se desarrolló una tecnología innovadora para la determinación y cuantificación del ADN de una muestra¹²⁷, tecnología que desembocaría posteriormente en la primera plataforma de *microarrays* de expresión.

Un *microarray* de ADN es una herramienta que permite realizar análisis genéticos diversos basados en la miniaturización de procesos biológicos permitiendo monitorizar simultáneamente el nivel de expresión de miles de genes en un conjunto de células¹²⁸. Actualmente, esta tecnología se está aplicando, entre otros, a la identificación de perfiles genéticos y dianas terapéuticas, seguimiento de terapia, medicina preventiva, toxicología de fármacos y diagnóstico molecular.

6.2 Fundamentos biológicos de los *microarrays*

Un gen puede definirse, desde un punto de vista bioquímico, como un segmento único de ácido desoxirribonucleico (ADN), de longitud variable, que codifica la información necesaria para la síntesis de una proteína. Cada segmento de ADN está compuesto por nucleótidos cuyas bases se complementan. Esta propiedad es la base molecular de la técnica de *microarrays*, donde hebras de ADN de diferente origen van a hibridizarse por complementariedad de las bases que las componen¹²⁸.

Durante la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) la doble cadena de ADN se despliega y una de ellas es usada como molde para generar una copia de ARN complementaria de cadena simple con la base uracilo (U) que reemplaza a la timina. El ARN es procesado posteriormente, de manera que a partir de un transcripto primario se generan diferentes clases entre ellas el ARN mensajero (ARNm).

En el proceso siguiente de traducción del mensaje genético, se sintetizan las proteínas en los ribosomas a partir del ARNm. La correspondencia entre las cuatro letras presentes en el ADN y los 20 aminoácidos que forman las proteínas está dada por el código genético, que vincula tres bases (codón) a un aminoácido. La proteína sufre diferentes modificaciones post-traduccionales hasta ser completamente funcional.

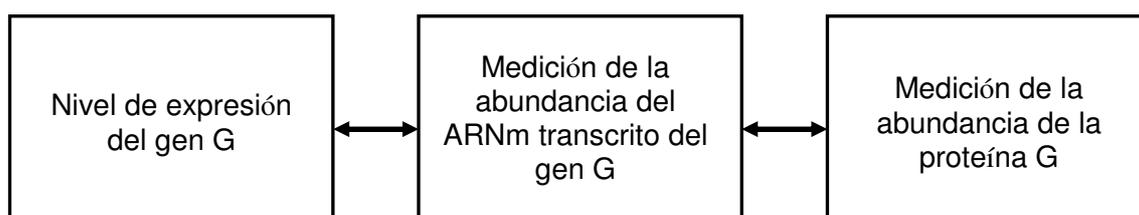
6.3. Tipos de *microarrays*

Los *microarrays* son dispositivos en los que existe una matriz sobre la que se disponen multitud de sondas ordenadas (generalmente material genético) y que nos permiten estudiar la expresión de miles de genes a la vez. En la práctica, abarcan una amplia gama que puede tener diferentes soportes (membranas o vidrio) y diferentes moléculas que interaccionan en este medio. Según el tipo de molécula considerada, podemos distinguir distintos tipos de *microarrays*: de expresión (oligonucleótidos o ADNc), proteínas, carbohidratos, tejidos, etc.

Microarrays de expresión

Son colecciones de moléculas de oligonucleótidos o ADNc (ADN complementario, molécula de ADN de una sola cadena) inmovilizadas en localizaciones conocidas sobre un soporte. Permiten cuantificar la presencia de miles de fragmentos de ARNm de secuencia conocida en las células de un individuo. La base teórica que sustenta la utilidad de los *microarrays* de expresión se corresponde con una visión tradicional del dogma central de la biología molecular, en la que se considera una relación uno-a-uno desde la secuencia de ADN (gen) a la secuencia de ARNm y a la proteína (Figura 5). Según esta visión, la medición de la abundancia de una determinada secuencia de ARNm nos ofrece una buena estimación del nivel de expresión del gen que se transcribe en dicha secuencia de ARNm y de la abundancia de la proteína codificada con dicha secuencia.

Figura 5. Dogma central de la biología molecular.



Microarrays de ADNc

Las sondas son producidas en laboratorios mediante la amplificación selectiva de ADNc por PCR en placas de 96 ó 384 pocillos. Cada uno de los puntos va a servir para determinar en qué medida se está expresando el gen al que representa.

Los *arrays* de ADNc son los más flexibles y usados en investigación porque permiten depositar genes o fragmentos de genes amplificados de cualquier especie y así diseñar y generar de manera sencilla y menos costosa el grupo de sondas. Por otro lado, requiere de réplicas tanto en el mismo soporte como duplicados técnicos, dado que su punto débil es el depósito del amplicón y la reproducibilidad de sus características físicas (dimensiones, área, límites).

Microarrays de oligonucleótidos

Las sondas son porciones de ADN sintético de cadena simple que pueden ser cortas (15-25 nucleótidos) o largas (50-120 nucleótidos). Están constituidos por miles de oligonucleótidos sintetizados “in situ” sobre un chip de silicio. El proceso de síntesis se lleva a cabo utilizando la luz ultravioleta y una máscara, que deja pasar la luz sólo por sitios específicos, para activar sólo los oligos que requieran su incorporación. Normalmente, se trabaja con *arrays* de oligos de 50 y 60 nucleótidos. Se suele emplear más de un oligo para cada gen, lo que facilita el control de la hibridación y la especificidad del mismo. También se incluyen oligos con una base cambiada para detectar posibles hibridaciones inespecíficas. En este tipo de *arrays*, sólo se hibrida la muestra problema en el *array*, evitándose errores en la incorporación de las sondas aunque existen los problemas relacionados con la eficiencia en la incorporación de la sonda.

Los *microarrays* que contienen fragmentos presintetizados (ADNc u oligos) pueden ser fabricados en laboratorios con infraestructura adecuada, pero los sintetizados *in situ* o los que vienen con genes preseleccionados prearreglados (*bioarrays*) deben ser adquiridos a diferentes proveedores que poseen plantas de fabricación con un nivel elevado de complejidad y delicados controles de calidad.

Microarrays de proteínas

Las sondas son anticuerpos fijados a portaobjetos de vidrio y los blancos son muestras de suero o tejido. Esta técnica se ve por el momento restringida por varios puntos que requieren de tiempo para esclarecerse. Entre ellos se puede mencionar la dificultad de fabricar e inmovilizar estructuras tridimensionales como son las proteínas y detectar interacciones de

proteínas plegadas, sin olvidar mencionar que no se dispone aún de colorantes fluorescentes que permitan cuantificar eficientemente a estas moléculas.

Microarrays de tejidos (TMA, *Tissue MicroArray*)

Esta técnica trata de resolver uno de los problemas principales y limitantes en análisis moleculares de tejidos: el tamaño limitado de la muestra y su conservación.

Las técnicas de análisis masivo se han aplicado también en el ámbito de la anatomía patológica. Los *arrays* de tejidos, en lugar de ADN, posibilitan el estudio de cientos de tumores de una vez, utilizando secciones mínimas de tejido representativas del tumor. De esta forma, se puede tener información de la expresión de un determinado marcador en un gran número de muestras. Esto hace que los *microarrays* de tejidos constituyan la herramienta ideal en el análisis de nuevos genes y para establecer diferencias moleculares entre los distintos grupos de muestras.

6.4 Tecnología de *microarrays* de expresión genética

El proceso de cuantificación de secuencias de ARNm en *microarrays* de expresión comprende los siguientes pasos:

1. Deposición e inmovilización de decenas de miles de sondas de ADNc u oligonucleótidos en posiciones conocidas y ordenadas de un soporte (habitualmente de plástico o vidrio).

2. Extracción de ARNm (*target* o diana) de una muestra. Debido a la inestabilidad del ARNm, es necesario realizar una transcripción inversa para obtener ADNc, que presenta mayor estabilidad. A continuación, se realiza un marcaje de la muestra con fluorocromos o biotina. Para *microarrays* de dos colores, se extrae ARNm de una muestra objetivo y una muestra referencia, realizándose el marcaje de cada una de ellas con fluorocromos distintos.

3. Las cadenas diana marcadas se ponen en contacto con el material genético depositado en el *microarray*, produciéndose la hibridación. Como resultado, cada punto del *microarray* adquiere un color e intensidad, en base al grado de hibridación de las secuencias del *microarray* con las cadenas diana marcadas.

4. Para medir el grado de hibridación, el *microarray* se excita mediante láser y se mide la intensidad y el color de la luz emitida por cada punto

En esta fase también se incluyen tareas de procesamiento de los datos necesarias antes del análisis de los mismos, como son las siguientes:

- Transformación logarítmica de escala. En *arrays* de ADNc el nivel de expresión de un gen se expresa como el cociente del valor de expresión en la muestra objetivo, respecto al valor de expresión en la muestra tomada como referencia. De este modo, un valor de expresión en el rango $[1, \text{infinito}]$ indica sobre-expresión del gen en la muestra objetivo respecto a la referencia, y un valor de expresión en el rango $[0, \text{infinito}]$ indica sub-expresión del gen en la muestra objetivo respecto a la referencia. Para igualar las amplitudes de ambos rangos, se efectúa una transformación logarítmica (habitualmente en base 2) de los datos de expresión relativa, que los traslada al rango $[-\text{infinito}, +\text{infinito}]$, con los valores positivos indicando sobre-expresión y valores negativos indicando sub-expresión.
- Tratamiento de réplicas. Habitualmente, un microarray inmoviliza varias sondas asociadas a un mismo gen. Para tratar los valores de expresión de estas sondas, primero se eliminan aquellos inconsistentes y posteriormente se agregan los valores del resto. Para la determinación de las réplicas inconsistentes, se aplica un umbral de distancia máxima entre la réplica y la mediana de todas las réplicas. Todas aquellas réplicas que se hallen a una distancia mayor que el umbral elegido son eliminadas. El resto son promediadas utilizando la media o mediana.
- Tratamiento de valores perdidos. El proceso de hibridación del microarray y de medición de la intensidad de luz resultante puede fallar para algunos puntos del *microarray*. En estos casos el valor desconocido se infiere utilizando algún método de recuperación de datos perdidos. Numerosos métodos han sido propuestos para la estimación de valores perdidos en *microarrays* aunque es el método de los K vecinos más cercanos (KNN o *K-nearest neighbours*) el que, por su simplicidad, es empleado más habitualmente. Este método estima el valor perdido de un gen a partir de los valores, para esa misma muestra, de los genes con patrones de expresión más similares a dicho gen en la matriz de expresión. Para ello necesita: 1) un valor apropiado para K; 2) una medida de similitud para los genes (habitualmente se utiliza la distancia euclídea, correlación de Pearson, o minimización de la varianza); y 3) un método de agregación de los valores de los genes más cercanos para estimar el valor perdido (habitualmente la media o mediana de la componente desconocida para los K vecinos más cercanos).

- Eliminación de datos planos. Se eliminan los patrones que no presenten un número determinado de valores que superen, en valor absoluto, un valor umbral.

Existen numerosas plataformas o programas informáticos de normalización y análisis de *microarrays* que implementan distintos métodos de preprocesamiento y normalización para distintas plataformas.

Principales plataformas *software* para la normalización y análisis de *microarrays* de expresión

- Bioconductor <http://www.bioconductor.org>
- GEPAS <http://gepas.bioinfo.cipf.es/>
- WebArrayDB <http://www.webarrydb.org>
- MayDay <http://www-ps.informatik.uni-tuebingen.de/mayday/wp/>
- MDAT (Matlab toolbox)

<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/5037-mdat>

- Gene ARMADA <http://www.grissom.gr/armada/>
- ArrayNorm http://genome.tugraz.at/arraynorm/arraynorm_description.shtml
- TM4 / MeV <http://www.tm4.org/mev/>
- PreP+07 <http://www.bitlab-es.com/prep>
- FlexArray <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray/>
- EMMA http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/emma_info/index.html

Principales plataformas para el análisis y anotación funcional

- DAVID <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>
- Babelomics <http://www.babelomics.org/>
- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) <http://www.broadinstitute.org/gsea/>

Análisis y modelado de los datos

En esta categoría pueden encuadrarse las técnicas estadísticas y de aprendizaje automático que se aplican sobre los datos ya preprocesados para la extracción de conocimiento. Las técnicas estadísticas son habitualmente empleadas como primera aproximación al análisis de *microarrays* de expresión, habiéndose desarrollado algunas específicas para el análisis de este tipo de datos, como SAM (*Significance Analysis of Microarrays*). Mientras que las técnicas estadísticas proporcionan una buena primera aproximación al análisis de *arrays* de expresión, resultan limitadas por el volumen y naturaleza

de los datos. De este modo, se hace necesaria la aplicación de técnicas de aprendizaje automático. En particular, resultarán de especial interés los algoritmos de Agrupamiento (*Clustering* y *Biclustering*).

Interpretación y validación de los resultados

Algunas de las técnicas más extendidas para la interpretación y validación de los resultados son la validación cruzada, los tests estadísticos, la inspección visual de los resultados y la validación biológica de los mismos respecto al conocimiento existente y a nuevos experimentos. En última instancia, será la facilidad de interpretar biológicamente los resultados y su adecuación a la realidad, lo que determinará la bondad y corrección de los experimentos y técnicas empleadas en fases anteriores.

6.6 Aplicaciones de los *microarrays* de expresión

Existen multitud de campos a los cuales se puede aplicar el estudio mediante *microarrays* de expresión. Centrándose en la investigación biomédica se encuentran:

A- Monitorización de la expresión genética. El patrón de expresión de un gen proporciona información acerca de su comportamiento en distintas muestras o condiciones experimentales. Así, la monitorización trata de identificar cuáles son las funciones de los distintos genes y en qué procesos celulares participan.

B- Generación de nuevos fármacos. Las aplicaciones de *microarrays* contribuyen a la identificación de dianas terapéuticas más efectivas, como parte de las primeras etapas del proceso de investigación en la industria farmacéutica y de generación de nuevos fármacos. Los *arrays* de expresión son una herramienta potencial para la investigación de los mecanismos por los cuales un fármaco actúa, así como su implicación en rutas metabólicas y posibles efectos secundarios.

C- Farmacogenómica. La farmacogenómica estudia cómo el componente genético de un paciente determina la respuesta frente a una terapia determinada. Esta información se utiliza para diseñar *microarrays* de expresión que puedan ser utilizados en la selección de fármacos a medida (medicina personalizada), el diseño de tratamientos más eficaces y la atenuación de posibles efectos secundarios en el paciente.

D- Diagnóstico molecular: taxonomía molecular del cáncer. El análisis de los *microarrays* de expresión puede conducir a la identificación de marcadores específicos para determinadas enfermedades (como los tumores) ayudando a la caracterización de las mismas. Por un lado, los tumores presentan patrones de expresión directamente relacionados con la

línea celular de la que proceden y con características clonales específicas de pacientes¹²⁹. Por otro, los patrones de expresión han ayudado a establecer diferencias en la biología y el pronóstico de los tumores¹³⁰. En general, el linaje celular es un elemento determinante del patrón de expresión de un tumor. Este compromiso clonal del patrón de expresión de un tumor, íntimamente relacionado con el paciente y su origen de linaje celular, permite obtener marcadores moleculares individuales y, con el tiempo, será muy útil en el desarrollo de terapias individualizadas como se ha comprobado en cáncer de mama¹³¹ y hepatocarcinomas¹³².

6.7 Limitaciones de los microarrays de expresión genética

Limitaciones conceptuales

La justificación biológica de por qué a partir de *microarrays* de expresión puede extraerse conocimiento útil acerca del estado funcional celular, se ampara en la visión tradicional del dogma central de la biología molecular, que consideraba una relación uno-a-uno desde la secuencia de ADN (gen), a la secuencia de ARNm, a la proteína. De esta forma, la medición de la abundancia del ARNm transcrito de un determinado gen, proveía de una aproximación del nivel de expresión de dicho gen en la muestra, de la abundancia de la proteína codificada en dicho gen y, por ende, del comportamiento de la célula de la muestra estudiada. Desafortunadamente, el proceso de expresión genética es más complejo. La visión moderna del dogma central de la biología molecular contempla un escenario más dinámico, según el cual un gen puede codificar más de una secuencia de ARNm. En el proceso de síntesis de ARNm a partir de la secuencia de ADN asociada a un gen usa un mecanismo denominado *splicing* (corte y empalme) para descartar ciertas regiones de la cadena de ADN (denominadas intrones), de forma que sólo los segmentos no eliminados (denominados exones) participan en la generación de la secuencia de ARNm y, por tanto, en la codificación de la proteína. Además, en el proceso de corte y empalme de los exones (*splicing*) no siempre se seleccionan los mismos exones (*alternative splicing*). Podemos considerar los intrones como regiones del gen que, en teoría, no codifican información, ya que aunque la información genética se encuentra almacenada en el ADN, no todas las secuencias de ADN son codificantes. Una secuencia codificante (exón) está formada por una sucesión de nucleótidos que, leídos de 3 en 3 y de manera no solapada, codifican una secuencia de aminoácidos, incluyendo, además, las señales de iniciación y terminación en ambos extremos. En el ADN humano, la mayor parte del ADN total es no codificante.

Actualmente existen un amplio campo de estudio que tiene por objeto la identificación de secuencias de ADN (denominadas genes ARN) que codifican moléculas funcionales de ARN que no son traducidas en proteínas, denominadas ARNs no codificantes (ARNnc). Estas moléculas de ARNnc desempeñan un papel importante en la regulación genética, ya que habitualmente se corresponden con moléculas de ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), u otros tipos de ARN como snoARN, microARNs, siARNs, piARNs, entre otros.

De este modo, distintos *splicings* sobre un mismo gen pueden producir distintas moléculas de ARNm, que pueden codificar distintas proteínas. Por ejemplo, se ha observado que un gen expresado en el cerebro de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), puede ser particionado de 40.000 formas diferentes¹³³.

Otras fuentes de variación se deben a los factores de transcripción que desencadenan la transcripción de un gen, o los sitios de unión (*binding sites*) de la región *upstream* (cadena arriba, antes de la región codificante) del gen a los que se une un determinado factor de transcripción. Distintos factores de transcripción pueden producir la transcripción de un determinado gen (en ocasiones, es la combinación de distintos factores la que desencadena el proceso). Además, estos factores pueden adherirse a distintos sitios de unión de los genes.

Cada factor de transcripción y/o sitio de unión al que se acople pueden producir la transcripción de una cadena diferente de ARNm. También es posible que se produzca la “edición” de una secuencia de ARNm antes de la traducción: una base de la secuencia puede ser cambiada por otra, modificándose así el aminoácido codificado con el triplete de bases afectado, o incluso convirtiendo un triplete que codifica un aminoácido en un triplete de terminación, finalizando antes la traducción, generándose en cualquiera de los dos casos una proteína distinta.

Además, la tasa de traducción es variable, es decir, puede que no se produzca la traducción siempre con la misma frecuencia ni velocidad, así que aunque en general existe una correlación entre la abundancia de ARNm y la abundancia de la proteína correspondiente, estas tasas de abundancia pueden presentar descompensaciones en determinados momentos.

También pueden producirse modificaciones en la estructura de la proteína después de la traducción. La proteína puede ser “troceada” en otras de menor tamaño, o algunas de sus regiones de aminoácidos pueden ser eliminadas o modificadas por adición (temporal o permanente) de otros grupos químicos, a veces con efectos drásticos en las propiedades funcionales o estructurales de la proteína, y por tanto en el comportamiento celular.

Con todos estos inconvenientes, hemos de tener presente que la tecnología de *microarrays* de expresión mide la abundancia de ARNm transcrito, que como se ha comentado

no tiene porqué corresponder exactamente con el nivel de expresión del gen asociado, ni con la abundancia de la proteína que codifica dicho gen. Dado que los niveles de ARNm pueden no reflejar los niveles de proteína, y que la expresión de una proteína no siempre tiene una consecuencia fisiológica, sería necesario utilizar una técnica de análisis con indicadores más sofisticados, como la localización de las proteínas y sus tasas de recambio, cambios estructurales y modificaciones de proteínas. Los chips de proteínas de alta densidad de integración han surgido recientemente como una tecnología complementaria a los microarrays de expresión y presentan un enorme potencial.

Limitaciones técnicas

Además de las limitaciones mencionadas anteriormente, existen numerosas fuentes de error debidas a imprecisiones e imperfecciones en el instrumental técnico utilizado para la hibridación y escaneado de los *microarrays* de expresión. Algunos de estos errores son, por ejemplo, desviaciones en la cantidad de material biológico impreso en cada *spot* del *microarray* o en la cantidad de reactivo fluorescente con el que se marcan las muestras, errores en la medición de luz por parte del escáner, etc. Estos errores son inevitables, y es necesario manejarlos para que el posterior análisis y las conclusiones que se extraigan del mismo sean fiables. El preprocesamiento y la normalización de los microarrays de expresión previo al análisis son, por lo tanto, fundamentales.

A pesar de las limitaciones comentadas, la tecnología de *microarrays* de expresión resulta relativamente barata y permite una alta densidad de integración, con la medición en paralelo de los niveles de expresión de miles de genes en decenas de muestras. Constituye, por tanto, una herramienta útil con la que extraer información acerca de los procesos celulares, a pesar de que los resultados obtenidos del análisis de *microarrays* deban ser interpretados con cuidado y validados con información procedente de otras fuentes de datos.

7. Hibridación *in situ* fluorescente (*Fluorescence in situ hybridation* o FISH)

La FISH es una técnica citogenética desarrollada a principios de los años 80¹³⁴ que se utiliza para detectar y localizar tanto presencia como ausencia de secuencias de ADN o cromosomas determinados. Se utilizan sondas que son complementarias y específicas de secuencias que se quieren identificar. Deben ser suficientemente largas para que se hibriden específicamente con la diana que se está estudiando, pero no tanto que dificulten el proceso

de hibridación mismo. Se marcan con fluoróforos, con dianas de algunos anticuerpos o con biotina.

Los tipos de sondas aplicados de forma rutinaria son:

- Centroméricas (marcan la región centromérica de los cromosomas). Están formadas por una secuencia repetitiva de ADN que hibridan con el ADN de la región centromérica del cromosoma.
- De pintado cromosómico, formadas por una batería de sondas que en conjunto hibridan con todo el cromosoma (marcan todo el cromosoma).
- De secuencia única (marcan un locus específico). Son las que se hibridan con el ADN de una región genómica concreta, correspondiente a un gen o a una banda cromosómica.

Para la realización de la técnica, en primer lugar, la muestra de ADN se debe desnaturalizar, proceso por el cual se separan las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del ADN. A la muestra desnaturalizada se le añade entonces la sonda de interés, marcada con un fluoróforo, que se asociará al ADN de la muestra en el sitio diana, en el proceso denominado hibridación, donde se vuelve a formar una doble hélice. La señal emitida por la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia y así la muestra de ADN se puede clasificar según la presencia o ausencia de la señal.

La FISH se usa ampliamente en Medicina para el diagnóstico de enfermedades causadas por alteraciones cromosómicas (por ejemplo el síndrome de Prader-Willi), alteraciones genéticas asociadas a respuesta a fármacos (por ejemplo deleciones de BCR-ABL1 alteran la respuesta a imatinib), para monitorizar la respuesta a algunos tratamientos¹³⁵, etc.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Metodología de investigación

Diseño

Estudio observacional longitudinal prospectivo.

Procedencia de las muestras

Los pacientes procedían del área de referencia del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), área sanitaria Granada-norte. Para la obtención de las muestras tumorales se contó con la colaboración del Banco de Tumores del HUVN.

Los pacientes participantes en el estudio se reclutaron desde Febrero de 2008 hasta Septiembre de 2010.

Población en estudio

De un total de 112 pacientes tratados en el HUVN por neoplasia de recto durante el periodo de realización de este estudio, se seleccionaron 45 que cumplían los criterios de inclusión establecidos: 35 para el estudio de expresión con *microarrays* y 10 para la validación de los genes diferencialmente expresados entre los pacientes respondedores y no respondedores mediante qRT-PCR.

- Criterios de inclusión

Se seleccionaron todos los pacientes diagnosticados de carcinoma de recto localmente avanzado, es decir, aquellos pacientes en los que el tumor invadía la serosa (T3) u otros órganos de forma directa (T4), y/o que presentaban afectación ganglionar (N1- N2) y que, además, eran subsidiarios de tratamiento neoadyuvante con radio y quimioterapia independientemente del sexo y edad. Por tanto, eran pacientes en estadios II y III de la enfermedad (clasificación según AJCC/UICC vigente, 6ª edición)¹³⁶.

- Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio los pacientes que presentaron alguna de las siguientes características:

- Carcinomas localizados a una distancia superior a 13 cm del borde anocutáneo en la rectoscopia rígida.
- Pacientes que por su co-morbilidad no eran subsidiarios de radioquimioterapia.
- Existencia de metástasis hepáticas y/o a distancia (estadio IV).

- Existencia de tumor sincrónico de colon.
- Sospecha de carga hereditaria (síndrome de poliposis familiar hereditaria y síndrome de Lynch).

Para ser incluidos en el estudio todos los pacientes aceptaron mediante la firma por ellos o por sus familiares del correspondiente consentimiento informado aceptado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUVN (Anexo 1).

Población diana

La población diana estaba constituida por aquellos pacientes con alta sospecha o diagnóstico de neoplasia rectal que, “a priori”, fuesen candidatos a terapia neoadyuvante.

Población accesible

Pacientes con alta sospecha o diagnóstico de neoplasia rectal del área sanitaria de referencia del HUVN.

Muestreo

La cohorte prospectiva se seleccionó mediante reclutamiento secuencial siguiendo el orden de llegada al Servicio de Cirugía del HUVN.

Se eligieron todos los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y exclusión.

Estimación del tamaño muestral

Se evaluó la correlación entre los niveles de expresión de los genes y la respuesta a tratamiento en pacientes con elevada sospecha o diagnóstico de neoplasia rectal que fuesen candidatos a terapia neoadyuvante. El tamaño de la muestra se calculó en base a aceptar un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste unilateral. Se decidió a trabajar con 35 pacientes, que debían cumplir con los criterios de inclusión en el estudio, para detectar una diferencia mínima del 50% entre la capacidad de respuesta de los pacientes, asumiendo una desviación estándar del 15%. De esta manera se alcanza un poder mayor de 0,8 para detectar las diferencias.

2. Protocolo de estudio

2.1 Flujo de pacientes

El flujo asistencial de los pacientes incluidos en el estudio se realizó en el marco de la Guía Clínica del Servicio Andaluz de Salud: “Proceso Asistencial integrado Cáncer Colorrectal”¹³⁷ en el que participan los siguientes Servicios del HUVN:

- Anatomía Patológica.
- Cirugía General y del Aparato Digestivo – Sección Cirugía Colorrectal.
- Digestivo.
- Medicina Nuclear.
- Oncología Médica.
- Oncología Radioterápica.
- Radiodiagnóstico.

Generalmente los pacientes fueron derivados desde su Centro de Salud por sospecha o certeza de neoplasia rectal al Servicio de Digestivo del HUVN de Granada.

2.2 Diagnóstico y estadificación

El procedimiento de diagnóstico-estadificación convencional incluyó:

- Historia clínica y exploración física (tacto rectal).
- Endoscopia digestiva baja (flexible).
- Biopsia.
- Determinación de niveles séricos de antígeno carcino-embriionario (CEA).
- Ecografía endorrectal (2D).
- Rectoscopia rígida.
- Resonancia magnética pélvica (RM).
- Tomografía por Emisión de Positrones con 18F-FDG, combinada con tomografía computerizada (TC).

Estadificación de la enfermedad local (TxNx)

Se empleó el sistema de clasificación por estadios TNM de la AJCC/UICC, 6ª Edición, puesto que era la que estaba vigente en el momento en que se empezaron a reclutar los pacientes (años 2008-2010)¹³⁶, como se puede ver en la tabla 7.

Tabla 7. Clasificación del tumor según TNM de AJCC/UICC: invasión del tumor primario (T), de los ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis a distancia (M).

Tumor primario (T)
Tx: el tumor primario no puede ser valorado.
T0: no hay signos de tumor primario.
Tis: carcinoma <i>in situ</i> : incluye las células cancerosas limitadas a la membrana basal glandular (intraepitelial) o lámina propia (intramucosa) sin extensión a la muscular de la mucosa hasta la submucosa.
T1: el tumor invade la submucosa.
T2: el tumor invade la muscular propia.
T3: el tumor invade a través de la muscular propia hasta la subserosa, o hasta tejidos pericólicos o perirrectales no peritoneales.
T4: el tumor invade directamente otros órganos o estructuras o perfora el peritoneo visceral. La invasión directa en T4 incluye otros segmentos colorrectales a través de serosa.
Ganglios linfáticos regionales (N)
Nx: los ganglios regionales no pueden ser valorados.
N0: ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales.
N1: metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales.
N2: metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.
Metástasis a distancia (M)
Mx: las metástasis no pueden ser valoradas.
M0: no existen metástasis a distancia.
M1: metástasis a distancia.

El Estadio I de la enfermedad se define como T1 ó T2 sin afectación metastásica ni ganglionar ni a distancia.

El Estadio II de la enfermedad se define como T3 ó T4 sin afectación metastásica ganglionar ni a distancia. En este estadio el T es factor pronóstico por lo que subdivide en IIa (T3N0) y IIb (T4N0).

El Estadio III de la enfermedad se caracteriza por afectación ganglionar metastásica. A su vez, se subclasifica en IIIa (T1 ó 2, N1), IIIb (T3 ó T4, N1) y IIIc (cualquier T, N2).

El Estadio IV de la enfermedad se define por la existencia de metástasis a distancia.

Exploraciones complementarias empleadas en la estadificación local

Para la estadificación clínica de la enfermedad local (TxNx) se emplearon la ecografía endorrectal y la resonancia magnética pélvica, salvo contraindicación de las mismas como masa estenosante que impide el paso de la sonda en el caso de la ecografía endorrectal o pacientes portadores de marcapasos en el caso de la RM. Cuando los resultados de ambas pruebas obtenidos para un mismo paciente fueron discordantes, a efectos prácticos se consideró el estadio que implicaba un peor pronóstico para el paciente.

Ecografía endorrectal

La ecografía endorrectal se practicó tras realizar rectoscopia rígida con una sonda B&K Medical 360º.

Los datos obtenidos mediante la realización de esta prueba fueron:

- Localización del tumor.
- Distancia al aparato esfinteriano.
- Capas del recto afectadas.
- Afectación ganglionar.

Resonancia magnética pélvica (RM)

La RM se realizó en un escáner Signa 1,5T (General Electrical Medical Systems, Milwaukee, WI, USA), utilizando una antena *Phased Array* (Torsopa, General Electrical Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) de cuatro elementos (Figura 7). Se utilizó el protocolo habitual del diagnóstico de cáncer de recto (distinto del recto prequirúrgico tras neoadyuvancia y del recto intervenido), con las siguientes secuencias:

- Axiales FRFSE (*fast recovery fast spin-echo*) potenciadas en T2 en planos axiales y sagitales a la pelvis.
- Axiales y coronales de alta resolución FRFSE potenciadas en T2 en planos axiales y coronales al tumor.
- Secuencias potenciadas en difusión con valores b: 0, 50 y 1000.

En la tabla 8 se pueden ver los parámetros de realización de las secuencias mencionadas.

Tabla 8. Parámetros de realización de las distintas secuencias de la RMN para la estadificación del cáncer de recto.

Parámetro	Secuencia de imagen				
	Sagital T2W	Axial T2W	Oblicua axial Sección fina T2	Coronal Sección fina T2	Potenciada en difusión axial
Secuencia pulso	FRFSE	FRFSE	FRFSE	FRFSE	SE/EPI(*b:1000)
Tiempo eco (mseg)	119	116	106	97,6	77
Tiempo repetición (mseg)	4220	5180	3200	3860	6000
Longitud tren eco	15	17	24	21	no
Ancho banda (kHz)	35,7	31,2	31,2	31,2	250
Grosor sección (mm)	5	3	3	3	5
Espaciado/nº localizaciones	0	0	0	0	0
Matriz	320x224	320x224	320x256	320x256	128x128
Nº señales adquiridas	4	4	3	3	4
Fase (cm)	27	28	22	22	38
Dirección frecuencia	Anterior a posterior	Derecha a izquierda	Anterior a posterior	Superior a inferior	Derecha a izquierda
Tiempo adquisición	4min 29 seg	4min 29seg	3min 47seg	2min 36seg	0min 54seg

EPI: echoplanar Imaging
FRFSE: fast recovery fast spin-echo
T2W: potenciada en T2
*b: 1000 seg/mm²

Figura 7. Imagen de estadificación de la RMN. Se aprecia un corte a nivel del tumor de recto donde existe una denopatía patológica, proyecciones axial y sagital.

Mediante este protocolo se determinaron las siguientes características de la lesión rectal:

- Localización del tumor.
- Tamaño tumoral.
- Distancia al aparato esfinteriano, considerando como tal el borde superior del músculo puborrectal.

- Extensión local de tumor, especificando qué capas del recto se encuentran afectas.
- Distancia a la fascia mesorrectal: margen de resección circunferencial (MRC).
- Relación con órganos vecinos.
- Existencia o no de tumor fuera de la fascia del mesorrecto.
- Posible ulceración de la reflexión peritoneal.
- Existencia de adenopatías en mesorrecto, especificando en el caso de que las haya si se encuentran en número mayor o menor de tres, y la distancia de los ganglios a la fascia mesorrectal.

Los radiólogos responsables de informar e están formados específicamente dentro del Proyecto Nacional Auditado Cáncer de Recto de la Asociación Española de Cirujanos.

Estadificación a distancia (Mx)

Para el diagnóstico de las metástasis (Mx), y siguiendo el protocolo específico vigente en nuestro centro, se empleó la tomografía de emisión de positrones multicorte (PET/TC) tras la administración de ¹⁸F-DG (18-fluorodesoxiglucosa).

A todos los pacientes participantes en el estudio se les realizaron dos exploraciones mediante estudio ¹⁸F-DG-PET/TC: una tras el diagnóstico de neoplasia rectal, para completar la estadificación de la enfermedad local y determinar la posibilidad de afectación metastásica a distancia, y otra a las 6 semanas tras la finalización del tratamiento neoadyuvante, para determinar la posible respuesta funcional del tumor a dicho tratamiento o bien evidenciar progresión de la enfermedad.

El intervalo transcurrido entre la finalización del tratamiento neoadyuvante y la realización del segundo estudio ¹⁸F-DG-PET/TC se fijó en seis semanas, con el objeto de minimizar los posibles efectos del tratamiento sobre la interpretación de los resultados obtenidos en el estudio mediante esta técnica, es decir, la posible captación de glucosa por el tejido inflamatorio a consecuencia de la radioterapia.

La preparación de los pacientes para la exploración consistió en ayuno de seis horas y no efectuar ejercicio físico en las horas previas a la realización de la misma. Previamente se determinó la glucemia, siendo recomendable la normalización de la misma, mediante insulina de acción rápida por vía intravenosa, cuando los niveles de glucosa fueron superiores a 150 mg/mL.

El estudio ¹⁸F-DG-PET/TC se llevó a cabo en un equipo híbrido PET/TC (Siemens Biograph 16, Knoxville, Tennessee, USA). La dosis de ¹⁸F-DG se estimó en función del peso corporal (oscilando entre 370 y 444 MBq), administrándose por vía intravenosa tras canalización de una

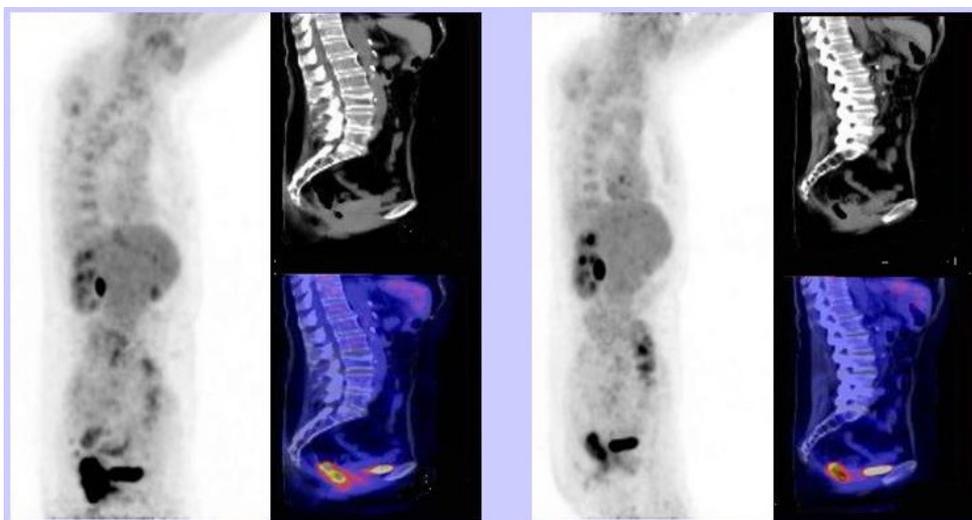
vía periférica, para evitar la extravasación de la dosis y permitir la hidratación del paciente mediante infusión de unos 250 cc de suero salino.

La adquisición de imágenes se realizó a los 50-60 minutos después de la inyección, tiempo necesario para una correcta metabolización de la ^{18}F FDG y captación por parte de las células tumorales.

A todos los pacientes se les realizó una exploración corporal que incluía desde la base del cráneo hasta el tercio superior del muslo adquiriendo datos para este estudio a tres minutos por paso de camilla. La reconstrucción de los datos obtenidos se realizó siguiendo algoritmos de reconstrucción iterativa, concretamente la técnica *Ordered Subset Expectation Maximization* (OSEM) utilizando para ello 2 iteraciones y 8 *subsets*.

Para una adecuada interpretación de los estudios cada exploración fue evaluada de forma visual, incluyendo las imágenes de emisión sin corrección de atenuación, y semicuantitativa (Figura 8).

Figura 8. Imagen de estadificación mediante PET/TC. A la izquierda en la estadificación al diagnóstico en la que se objetiva captación a nivel del cáncer de recto. A la derecha la exploración hecha al mismo paciente después de la neoadyuvancia en la que se puede ver una respuesta parcial, con disminución de la captación tumoral.



Análisis Cualitativo o Visual

- Se consideraron patológicos aquellos focos de hipercaptación del trazador que no fueran atribuibles a hallazgos de carácter fisiológico.

- Se analizó la presencia de actividad relevante a nivel rectal, y la visualización de las imágenes de fusión PET/TC permitió la correlación de los hallazgos funcionales con las alteraciones estructurales, en nuestro caso masas a nivel rectal.
- Cualquier lesión hipermetabólica detectada en el resto del organismo fue considerada a priori como probable lesión tumoral maligna, prestando especial atención a aquellos órganos donde son más habituales las metástasis de cáncer de recto como el hígado o el pulmón.

Análisis Semicuantitativo

El grado de captación de la zona problema, se determinó mediante el cálculo del índice SUV (*Standard Uptake Value* o valor de captación estandarizado) de la región de interés (ROI) en relación a la dosis inyectada y al peso del paciente (Figura 9). Se calcularon tanto el SUV máximo de la lesión como el SUV medio, que resulta del cociente entre la actividad metabólica total y el volumen tumoral como se puede ver en la figura 9. Este parámetro es útil para evaluar la respuesta terapéutica en un paciente individual ya que se puede asumir que el error cometido (antes y después), si se mantienen constantes los parámetros de la exploración, está afectado por los mismos factores.

Figura 9. Cálculo del índice SUV.

$SUV = C_{PET} (T) / (\text{Dosis inyectada} / \text{peso del paciente})$
SUV: valor de captación estandarizado
$C_{PET} (T)$: dosis administrada corregida por desintegración/ actividad del tumor

2.3 Toma de muestra pre-tratamiento neoadyuvante

De cada paciente participante en el estudio se obtuvo tejido tumoral y tejido normal antes del tratamiento (mediante realización de biopsia), que fue rápidamente congelado con nitrógeno líquido, en tubos que contenían un estabilizador de ácido ribonucleico (ARN) (PAXgene Blood RNA tubes, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) para la purificación y aislamiento del correspondiente ARN, con el que posteriormente se procedió a la hibridación de los microarrays previstos en el estudio.

2.4 Tratamiento neoadyuvante

El tratamiento neoadyuvante que se realizó en los pacientes incluidos en el estudio constaba de:

Radioterapia

Se administró radioterapia con intención radical con una dosis total de 50,4 Gy sobre la lesión tumoral y mesorrecto incluyendo las adenopatías locorregionales. El tratamiento se aplicó en fracciones de 1,8 Gy durante 25 sesiones, con una sobreimpresión final sobre el tumor de tres sesiones de 1,8 Gy.

Quimioterapia

El protocolo de quimioterapia consistió en capecitabina (Xeloda®) sola a una dosis de 825 mg/m² cada 12h, concomitante con la radioterapia, o la misma pauta de capecitabina combinada con oxaliplatino intravenoso (50 mg/ m²) una vez por semana.

2.5 Tratamiento quirúrgico

Según el esquema terapéutico, la ventana de espera entre la finalización de la radioquimioterapia y la intervención quirúrgica fue de 8 semanas. La técnica quirúrgica empleada fue la habitual, con escisión total del mesorrecto tanto para las resecciones anteriores como para las amputaciones de recto.

Todos los cirujanos responsables, así como los resultados obtenidos de los pacientes incluidos en esta Tesis, están avalados por la Asociación Española de Cirujanos dentro de su Proyecto Docente Auditado Cáncer de Recto (Proyecto Vikingo AEC)¹³⁸.

Figura 10. Pieza quirúrgica de resección de recto en la que se puede ver una escisión mesorrectal completa.



2.6 Estadificación anatomopatológica post-quirúrgica

La pieza quirúrgica fue remitida al Servicio de Anatomía Patológica donde se realizó un examen exhaustivo, también auditado por la Asociación Española de Cirujanos en su proyecto nacional de cáncer de recto, para determinar el estadio anatomopatológico post-quirúrgico (ypTxNx), el margen circunferencial y el grado de respuesta tumoral (TRG). La pieza siempre se fija en formaldehído para luego ser cortada en su eje axial.

En el informe histológico quedaron detallados los siguientes aspectos:

- Existencia o no de células tumorales en la pieza.
- Capas de recto afectadas.
- Número de ganglios analizados.
- Invasión carcinomatosa ganglionar o acúmulos celulares mucoides.
- Afectación o no del margen circunferencial.
- Afectación o no de los márgenes quirúrgicos.
- Escisión de mesorrecto satisfactoria o no.
- Grado de respuesta tumoral (Clasificación TRG de Mandard).

2.7 Valoración de la respuesta al tratamiento neoadyuvante

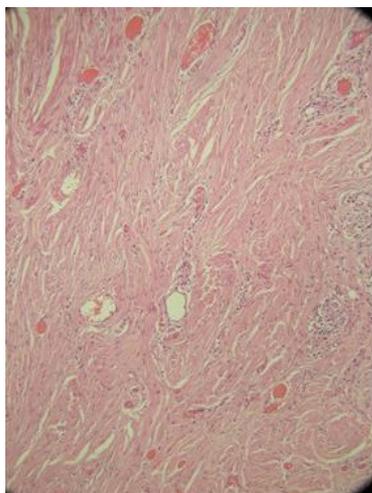
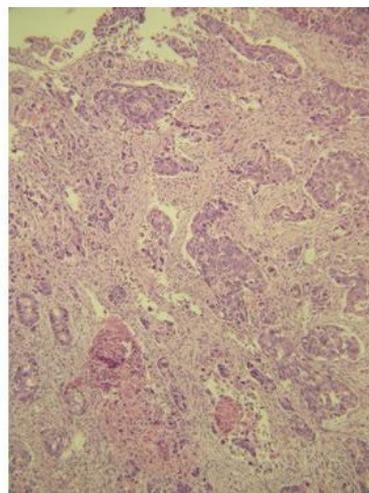
Respuesta Histológica

- Grado de Regresión Tumoral (TRG)

El grado de respuesta tumoral a la neoadyuvancia se analizó según el método semicuantitativo estándar del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, utilizando los grados de regresión tumoral de Mandard¹⁰⁶. La regresión tumoral se caracteriza por una serie de cambios citológicos y a nivel del estroma, en base a los cuales, la respuesta del tumor primario se clasificó en cinco grados histológicos de regresión (Figura 11):

- Grado 1: Ausencia de células neoplásicas.
- Grado 2: Alguna célula neoplásica con claro predominio de fibrosis.
- Grado 3: Células neoplásicas en la pieza, si bien la fibrosis sigue siendo predominante.
- Grado 4: Predominio de células neoplásicas sobre el componente fibrótico.
- Grado 5: Ausencia de regresión.

Figura 11. Dos muestras de Anatomía Patológica. Al microscopio en la muestra de la izquierda se objetiva un TRG 1 (respuesta completa) y en la de la derecha un TRG 4 (predominio de células neoplásicas sobre el componente fibrótico).

**TRG 1****TRG 4**

Según el grado de regresión tumoral los pacientes, se distribuyeron en dos grupos, denominados, respectivamente como respondedores (grados de regresión 1 y 2) y no respondedores (grados 3 al 5).

- *Estadio Anatomopatológico (ypTNM)*

Atendiendo al estadio anatomopatológico (ypTNM) se considera respuesta patológica completa (ypRC) a la ausencia de células neoplásicas en la pieza, *Downstaging* o infraestadificación a cualquier reducción del estadio tumoral ypTNM frente al estadio clínico antes de la radioquimioterapia (cTNM) y *Downsizing* o reducción del tamaño a cualquier reducción de la ypT frente al estadio clínico pretratamiento (cT) evidenciado bien por ecografía endorrectal o por resonancia pélvica¹²¹.

2.8 Análisis de supervivencia

Se ha realizado un seguimiento a los pacientes del estudio hasta el 1/12/2012 siguiendo el protocolo del Proceso de Cáncer Colorrectal. Posteriormente, se analizó la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años de seguimiento, mediante la curva Kaplan-Meier, utilizando el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc. 2006).

3. Descripción del *microarray*

Para el estudio del perfil de expresión génica se utilizaron los *microarrays* de genoma completo humano del sistema CodeLink™ comercializados por Applied Microarrays (Tempe, AZ, USA).

El diseño de cada *bioarray* de CodeLink® consiste en una superficie cristalina recubierta por una matriz tridimensional de un gel acuoso. El cristal es sometido al fotoacoplamiento de un prepolímero hidrofílico de acrilamida que proporciona una superficie de unión, gracias a la presencia en su interior de un éster activado. Este polímero está covalentemente unido a sí mismo y a la superficie de cristal y proporciona el sitio de unión para los C6-aminooligonucleótidos que son depositados sobre el polímero por robots dispensadores piezoeléctricos. Esta matriz va a proporcionar un ambiente acuoso que permite a la diana de oligonucleótidos estar separada del soporte cristalino y así maximizar la interacción con la sonda marcada procedente de la muestra. El tipo de ácido nucleico inmovilizado sobre el soporte es un oligómero de 30 bases pre-sintetizado y fabricado mediante el método de deposición. El número total de genes dispuestos en el *microarray* es de 54.841 que corresponden al genoma completo humano (*Code Link Human Whole Genome Bioarray*), de modo que cada punto del *microarray* va a representar un gen. Entre ellos podemos identificar tres grupos:

- Genes cuya función molecular es conocida.
- Genes específicos de tejido y genes seleccionados por su localización cromosómica.
- Controles positivos y negativos. Los controles positivos son genes que se expresan de forma similar en todos los tejidos y estados. Los controles negativos son un pequeño grupo de genes de otras especies diferentes a la especie humana donde por tanto, no debe hibridarse nada de muestra en esos puntos del *microarray*.
- Además, se incluyen en algunos puntos agua, tampón y blancos de PCRs usadas para amplificar los clones.

Tras la hibridación de la muestra en el *microarray*, las medidas de intensidad de fluorescencia están sujetas a la substracción del fondo (*background*) y los valores de intensidad de fluorescencia son normalizados con la media de los valores de los cocientes de los puntos del *microarray*.

El proceso de verificación de las secuencias de los clones incluidos en los *microarrays* está sujeto a modificaciones debidas al continuo avance en la identificación de secuencias. Se detectaron algunos clones cuya secuencia no correspondía con la del gen al que

supuestamente representaba por lo que al intentar acceder a la información del clon éste estaba descatalogado.

4. Preparación de la muestra e hibridación de los *microarrays*

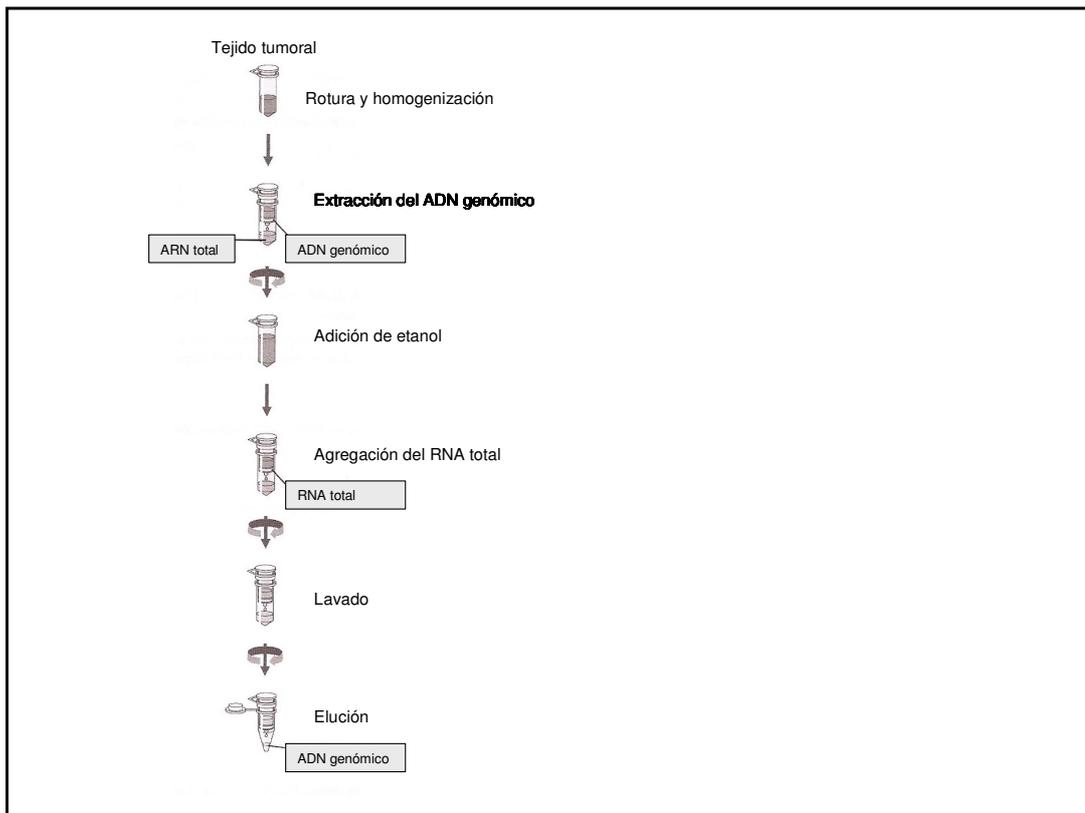
De cada uno de los pacientes participantes en el estudio se procedió a extraer muestras de tejido tumoral y normal antes del tratamiento radioquimioterápico.

4.1. Aislamiento, precipitación, cuantificación y la calidad del ARN

Aislamiento de ARN

El material empleado para el manejo de ARN se trató con dietil-piromcarbonato (DEPC) al 1% y, posteriormente, se autoclavó para evitar cualquier posible contaminación con ribonucleasas (RNasas).

El ARN total se extrajo a partir de 30 mg de tejido fresco conservado en RNA Later (Ambion Biosystems) utilizando un equipo Tissue Lyser (Qiagen, Holanda) y el equipo de extracción RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Holanda) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (Figura 12). Todo el proceso debe realizarse en frío para evitar la degradación del ARN.

Figura 12. Proceso de extracción del ARN del tejido tumoral.

Cuantificación y pureza del ARN

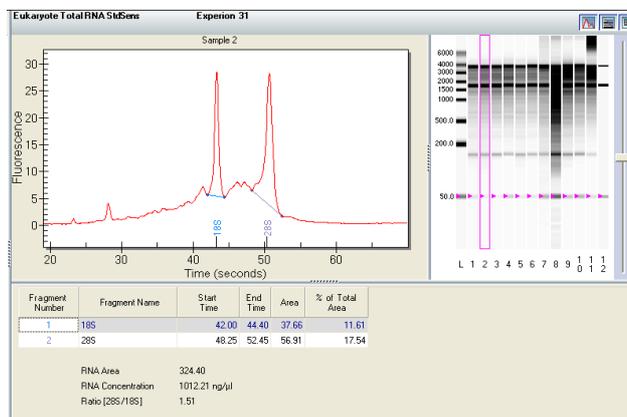
Verificación de la calidad del ARN por electroforesis capilar

La calidad del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis capilar en un bioanalizador Experion® (Bio-Rad, Richmond, VI, USA). Este método emplea el ARN ribosómico para inferir la calidad del ARN mensajero, ya que, del ARN total, el ribosómico constituye más del 80% y el mensajero solo entre el 1% y el 3%, lo que hace imposible su detección directa.

El bioanalizador Experion® (Bio-Rad, Richmond, VI, USA) es un sistema de electroforesis automatizado basado en la tecnología de microfluídica. La pieza clave del Experion® es el gel que contiene una serie de pocillos de plástico unidos a una superficie de cristal que está conectada a una red de microcanales que interseccionan con cada uno de los pocillos. Cuando estos canales se ceban con el gel y se cargan las muestras de ARN, la estación de electroforesis conduce cada muestra por un microcanal aplicando un voltaje preciso. El Software del Experion® genera electroforetogramas que permiten analizar la calidad del ARN. Primero se genera el electroforetograma de los marcadores de ARN (*ladder*) en el que se identifican nueve picos a diferentes tamaños. Después, se genera el electroforetograma de la muestra de ARN donde se observan dos picos de pequeño tamaño que corresponden a un marcador interno y

al ARN ribosomal 5S, y dos picos mayores que corresponden al ARN 18S y 28S respectivamente (Figura 13).

Figura 13. El software del Bioanalizador Experion® calcula la dos parámetros numéricos que indican la integridad del RNA: la relación entre los RNA ribosómicos 28S y 18S (28S/18S).



Cuantificación espectrofotométrica del ARN

La cuantificación del ARN total se determinó mediante un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Con tan solo 1 µL de muestra este instrumento permite conocer la cantidad de ARN de la muestra midiendo a 260 nm. Si el ARN no presenta impurezas la razón 260/280 estará entre 1,9 y 2,1.

4.2 Preparación e hibridación de los *microarrays*

Síntesis del ADN complementario

El ARN total (0,2-2 µg) obtenido es sometido a una transcripción reversa en presencia de T7-oligo (dT) para obtener ADN complementario (ADNc). Se requieren dos pasos:

- Síntesis de la primera cadena de ADN complementario: este proceso dura dos horas y se realiza a una temperatura de 42°C, utilizando el tampón *10x first-strand buffer* (suministrado por el fabricante en el MessageCeAmplIBiotin Enhanced™ Kit, Applied Biosystems, USA), dNTPs, inhibidores de las RNasas y la enzima retro-transcriptasa.
- Síntesis de la segunda cadena: se utiliza el tampón *10x second-strand buffer* (provisto en el MessageAmp II-Biotin Enhanced Kit™, Applied Biosystems, USA), dNTPs, y las enzimas ADN polimerasa y ribonucleasa H. Estos reactivos para la síntesis de la segunda cadena de cDNA se mezclan con los del primer paso procediéndose, a continuación, a incubar durante 2h a 16°C.

Purificación del ADNc de doble cadena.

Una vez sintetizado, el cDNA es purificado mediante columnas de silica-gel incluidas en el MessageAmp II Biotin Enhanced™ PCR purification Kit (Ambion, Applied Biosystems, CA, USA) y concentrado mediante precipitación.

Síntesis y marcaje

A continuación, se realiza la síntesis del ARNc mediante transcripción *in vitro* (IVT) y marcaje con ¹⁵UTP biotina, dejando incubar la reacción durante 14 horas a 37°C. Posteriormente, se purifica y eluye el ARNc marcado con biotina utilizando el equipo comercial MessageAmp II Biotin Enhanced™ PCR Purification Kit (Ambion, Applied Biosystems, CA, USA), así como se comprueba su concentración, pureza y calidad. La A₂₆₀ debe ser de 0,15 para continuar con el proceso.

Fragmentación e hibridación

El paso siguiente consiste en fragmentar el ARNc a 94°C durante 20 min e hibridar las muestras en los cristales (CodeLink®, Applied Microarrays) durante 18-24h a 37°C en un agitador Innova 4080 (New Brunswick, Canada). Posteriormente, el *microarray* se retira del agitador y se procede a separar de cada uno la cámara de hibridación. El cristal del *microarray* se lava con tampón TNT 0,75X (0,1 M Tris-HCl a pH 6, 0,15 M de NaCl y 0,05% de Tween® 20) a temperatura ambiente y incubándose a 46°C durante 1 hora en tampón 0,75x TNT precalentado a igual temperatura durante al menos 16 horas.

Durante la incubación se prepara la mezcla de reactivos para la posterior reacción de hibridación: 78 µL del componente A del tampón de hibridación y 130 µL del componente B. La solución de hibridación y el ARNc fragmentado se llevan a un volumen final de 260µL con agua libre de ribonucleasas, incubándose posteriormente durante 5 minutos a 90°C para su desnaturalización. A continuación, se cargan 250 µL de la mezcla de hibridación en el *microarray*. Una vez cargado, se sellan los puertos de la cámara de hibridación con tiras de sellado de 1 cm y se introduce sobre un soporte en el agitador orbital Innova® 4080 (New Brunswick, USA). La hibridación en el agitador orbital dura 18 horas y se realiza a una velocidad de 300 rpm y 37°C.

La detección de la señal se realiza empleando una dilución 1:500 de streptavidina (Cy5-Streptavidin) en tampón TNB (0,1 M Tris-HCl a pH 6, 0,15 M de NaCl y 0,5% de reactivo de bloqueo (NEN Blocking reagent, Perkin-Elmer). En esta solución cada *microarray* se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de marcaje se elimina lavando cada *microarray* cuatro veces durante cinco minutos en tampón 1xTNT. Finalmente, se realiza un

lavado con 0,1X SSC/0.05% Tween® (BioRad, Richmond, Uj, USA) durante 30 segundos secándose cada *microarray* por centrifugación a 2000 rpm durante 3 minutos. Llegado este punto el *microarray* está preparado para ser leído en un escáner.

Los *microarrays* se realizaron por duplicado a partir del cARN obtenido de cada paciente.

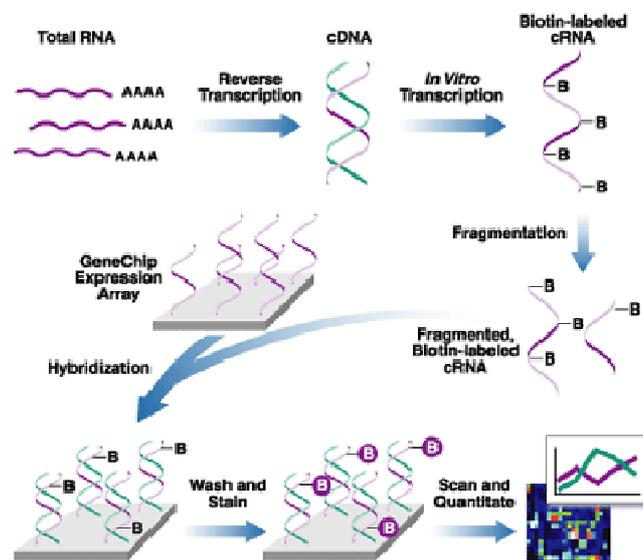
Lectura del *microarray*

Numerosas técnicas de laboratorio basan su funcionamiento en la detección de fluorescencia; localización de moléculas en células, tejidos por microscopía, estudios de poblaciones celulares (marcadores de superficie, contenido en ADN) por citometría de flujo, estudios de genómica utilizando *microarrays*. La medida de la intensidad de fluorescencia (fotones emitidos) se lleva a cabo por un detector fotosensible, que se encuentra en diversos tipos de instrumentos diseñados para analizar toda clase de muestras, que produce una información diferente.

La lectura de cada *microarray* se realiza con el escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) mediante un láser a 635 nm, un voltaje de tubo fotomúltiple (PMT) de 600 V y una resolución de 10 µm. El escáner utiliza el CodeLink® Expression Scanning Software (Applied Microarrays, Tempe, Az, USA) y las imágenes de cada cristal se analizan posteriormente con el CodeLink® Expression Analysis Software v5.0 (Applied Microarrays, Tempe, Az, USA).

En la figura 14 se puede ver un esquema del proceso general de realización de los *microarrays*.

Figura 14. Esquema general del proceso de extracción del ARN, marcaje, hibridación en el *microarray* y posterior escaneo de los cristales.



5. Análisis de los datos de expresión de microarrays

5.1. Normalización

Antes de poder usar los datos experimentales es necesario normalizarlos para intentar ajustar los efectos que son debidos a las variaciones en la tecnología y no en la biología. En particular, con la normalización se pretende ajustar las diferencias existentes entre los fluorocromos, en el marcaje, intensidad, etc.

El programa informático fue implementado en el lenguaje de programación R y ha sido diseñado para análisis de datos de *microarrays* de plataformas General Electric (Codelink®). Comprende la normalización y control de calidad de los *microarrays*, así como el análisis estadístico para la identificación de genes con un comportamiento diferente entre los grupos de muestras. Los métodos implementados incluyeron la normalización de mediana y corrección del fondo con aplicación del método LOESS (regresión polinómica combinada).

La normalización de los *microarrays* generó diversas gráficas que mostraban la homogeneidad entre las intensidades de los *microarrays* después del proceso de normalización, como se puede ver en las figuras 15, 16 y 17.

Figura 15. Gráfica MA para 8 *microarrays* del estudio. M y A se definen como: $M = \log_2(I_1) - \log_2(I_2)$ $A = 1/2 (\log_2(I_1) + \log_2(I_2))$ donde I_1 es la intensidad de un *microarray* particular e I_2 es la intensidad promedio de todos los *microarrays*. La distribución de puntos en las gráficas MA se concentró alrededor del eje $M=0$, no existiendo sesgos en la media de M.

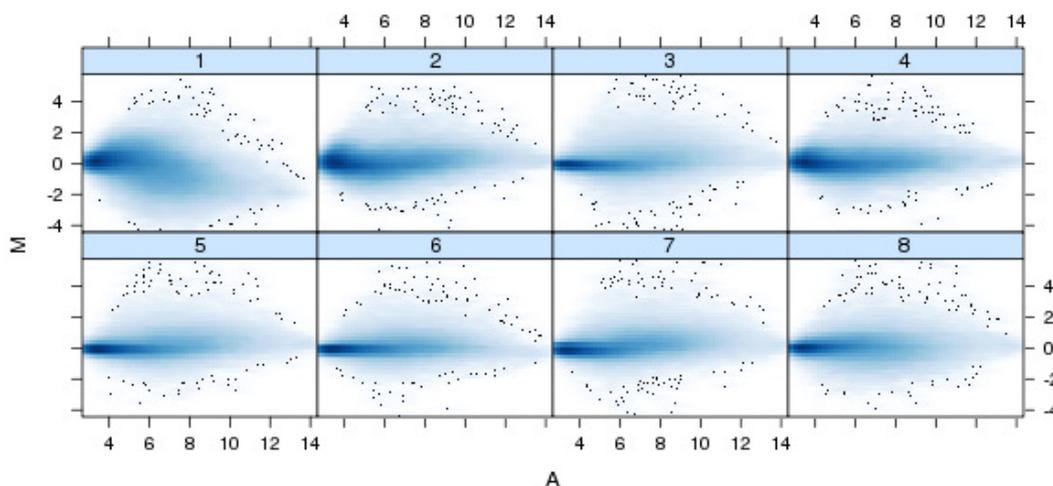


Figura 16. Diagramas de cajas del \log_2 (Intensidades). Cada caja se corresponde con un *microarray*. Se puede comprobar que tras la normalización, los *microarrays* son homogéneos ya que las cajas son de amplitud similar y están centradas en posiciones cercanas de el eje Y.

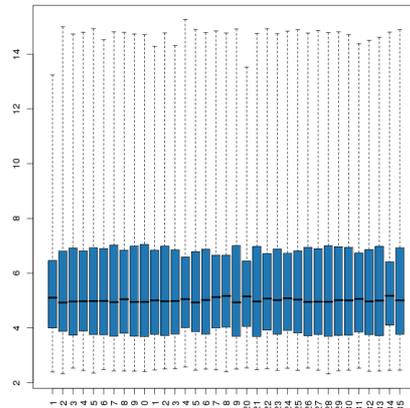
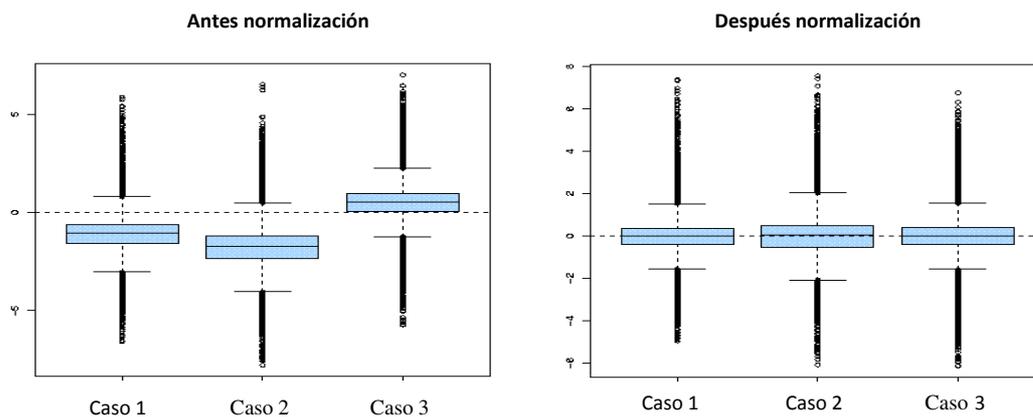


Figura 17. Diagramas de cajas de la normalización. Las cajas para cada caso hibridado en un *microarray* distinto, muestran la intensidad de fluorescencia antes y después de la normalización de los datos.



5.2. Significance Analysis of Microarrays (SAM)

Se utilizó la técnica SAM (*Significance Analysis of Microarrays*)¹³⁹ para identificar genes que varían su comportamiento de forma significativa entre un conjunto de experimentos con microarrays.

Una matriz de expresión X_{pn} con p filas y n columnas, es una matriz numérica en la que se dispone un gen por cada fila, el resultado de un experimento de microarrays por cada columna, de forma que la posición (i, j) de la matriz contendrá el nivel de expresión del gen i bajo la muestra experimental j . SAM toma como entrada una matriz de expresión y el valor de un parámetro Δ fijado por el usuario, para discriminar entre genes que cambian su expresión

de forma significativa y no significativa. El parámetro Δ se fija de forma empírica, en función del número de genes significativos que se deseen extraer y del grado de significación estadística que se exige, en nuestro caso será de $p < 0,05$. En definitiva, para obtener un *false discovery rate* (fdr) $< 0,05$.

Una vez obtenidos los genes significativamente expresados, se calculan sus respectivos niveles de sobre/sub-expresión con respecto al microarray con el que se compara, para ello se calcula el logaritmo del cociente de cada gen entre el valor de su expresión en un paciente y el valor de su expresión en el microarray de referencia¹³⁹.

Existen distintos tipos de experimentos para los que se puede aplicar esta técnica. En este estudio fue el denominado *two class unpaired*: dos conjuntos de experimentos (que llamaremos C_1 y C_2) con unidades experimentales diferentes, por ejemplo, C_1 puede corresponderse con distintos pacientes que sufren una dolencia determinada y C_2 a pacientes sanos. El funcionamiento de SAM es el siguiente:

Sean los niveles de expresión x_{ij} con $i = 1, 2, \dots, p$ genes y $j = 1, 2, \dots, n$ experimentos diferenciados en dos clases: C_1 y C_2 .

1.- Para cada gen i calcular el estadístico d_i que mide la diferencia de expresión relativa para el gen i entre los dos grupos de pacientes C_1 y C_2 :

$$d_i = \frac{r_i}{s_i + s_0}$$

2.- Ordenar los genes en base a su estadístico. Así se produce la lista $d_{(1)} < d_{(2)} < d_{(3)} < \dots < d_{(p)}$, donde $d_{(1)}$ es el valor mínimo y así sucesivamente.

3.- Realizar B permutaciones de los experimentos.

4.- Para cada permutación b , se calculan los estadísticos d_i^b y se ordenan obteniendo la lista $d_{(1)}^b < d_{(2)}^b < d_{(3)}^b < \dots < d_{(p)}^b$.

5.- A partir de los estadísticos calculados para cada una de las B permutaciones, se estiman los valores de los estadísticos originales (los calculados con la clasificación correcta de las columnas). Esta estimación se lleva a cabo haciendo la media de los valores de la primera posición de las listas obtenidas en el punto 4 ($\bar{d}_{(1)}$), de la segunda posición ($\bar{d}_{(2)}$), etc. Es decir, se calcula:

$$\bar{d}_{(i)} = \left(\frac{1}{B} \right) \times \sum_{b=1}^B d_{(i)}^b, \text{ para } i = 1, 2, \dots, p$$

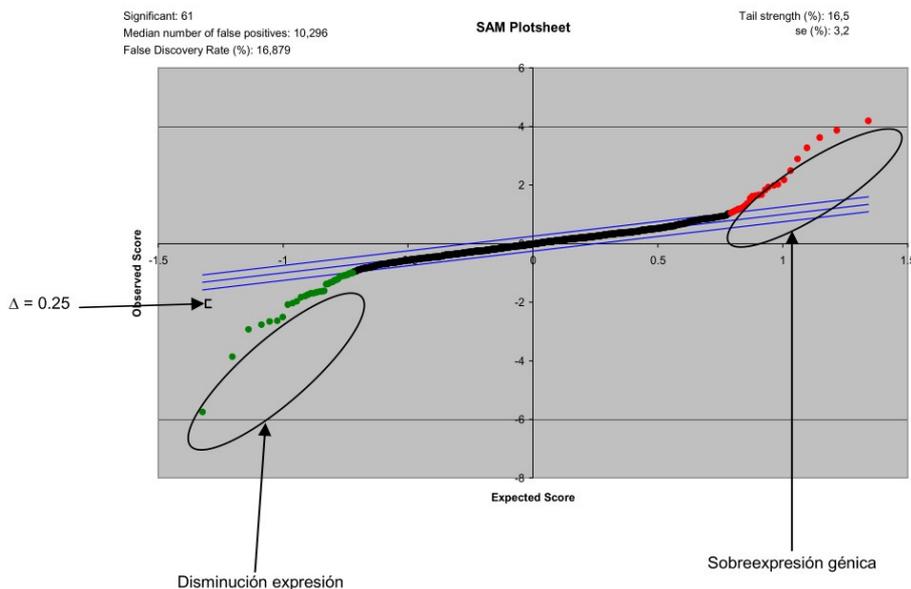
6.- Se representan gráficamente los valores de los $\bar{d}_{(i)}$ frente a los $d_{(i)}$ (ver figura 18). Una vez fijado el valor de Δ , se recorre la gráfica partiendo desde el (0,0) hacia la derecha hasta encontrar un $i1$ tal que $\bar{d}_{(i1)} - d_{(i1)} > \Delta$. A todos los genes que quedan más allá del $i1$ se

les llama *significativos positivos*. Estos serán los genes que han aumentado su expresión significativamente en las muestras de la clase C_2 respecto a las de la clase C_1 .

A su vez, se recorre también la gráfica hacia la izquierda partiendo del (0,0) hasta encontrar un i_2 tal que $\bar{d}_{(i_2)} - d_{(i_2)} > \Delta$. Todos los genes que quedan más a la izquierda de i_2 son *significativos negativos*. Estos serán los genes que han disminuido su expresión significativamente en las muestras de la clase C_2 respecto a las de la clase C_1 .

7.- Cálculo del q-value para cada gen. El q-value de un gen es el equivalente al bien conocido *p-value*, con el añadido de que está corregido para *tests* con múltiples hipótesis¹⁴⁰.

Figura 18. Ejemplo gráfico del análisis de significación de los microarrays (SAM).



5.3. Agrupamiento (*clustering*)

La información recogida de los microarrays puede ser analizada mediante un algoritmo de agrupación (*clustering*) jerárquica, que genera dendrogramas, agrupando los elementos según su similitud. En el dendrograma, la longitud de las ramas es una representación de la distancia entre los distintos partes del mismo.

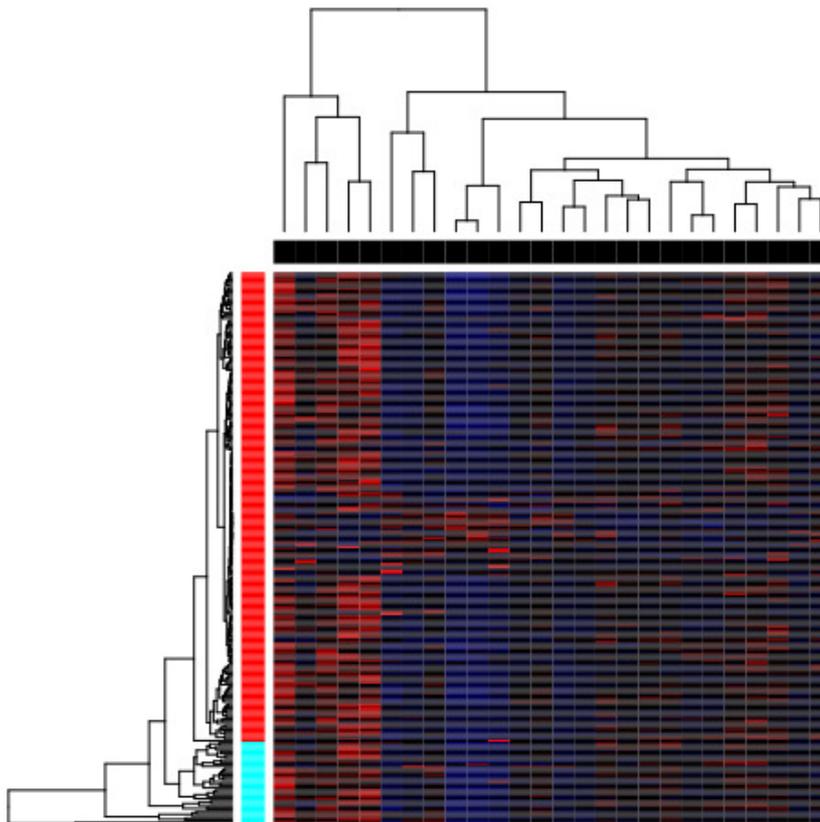
En la figura 19 se observa un dendrograma en el cual los las muestras se sitúan en la parte superior en horizontal y los genes en vertical. Los genes sobre-expresados van a aparecer en color rojo y los reprimidos en color azul (según opción seleccionada). Este análisis nos permite definir el patrón de agrupamiento de las muestras tumorales, según el perfil de

expresión de los genes. Para la agrupación de las muestras en base a los perfiles de expresión se ha utilizado el programa de agrupamiento jerárquico desarrollado por el Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial de la Universidad de Granada.

5.4. Análisis de las vías metabólicas

Se empleó programa IPA, Ingenuity Pathways Analysis v.5.0 (Ingenuity Systems Inc.), para identificar las funciones biológicas en las que estaban implicados los genes diferencialmente expresados y que mejor diferencian los dos grupos (respondedores/no respondedores). Este programa informático permite analizar e integrar de forma más comprensible la información proveniente de microarrays, generando modelos de interacción de las distintas rutas y genes implicados.

Figura 19. Dendograma correspondiente a la agrupación jerárquica de los patrones de expresión de los genes. En vertical se disponen las muestras y en horizontal los genes. En color rojo aparecen los genes sobre-expresados y en color azul los reprimidos.



6. Validación de los resultados de los microarrays: qRT-PCR.

Los estudios a gran escala de expresión génica mediante microarrays requieren de la validación de los resultados obtenidos. Se ha realizado la comprobación de algunos de los genes, cuya expresión diferencial ha mostrado resultados significativos, utilizando qRT-PCR.

Se han utilizado sondas comerciales diseñadas con el software Solaris (Dharmacon Chicago, IL USA) y un equipo MX3005P (Stratagene, Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA).

Reacción de retrotranscripción

La RT-PCR (retrotranscriptasa (RT)-reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) es una PCR convencional que amplifica un ADN complementario (ADNc) obtenido por transcripción inversa de un ARNm, y que permite detectar la expresión de un gen particular. Otras técnicas, usadas también para detectar la expresión de genes, como el Northern blot, no llegan a tener la sensibilidad de la RT-PCR. Así, esta técnica es utilizada ampliamente para caracterizar los patrones de expresión de los ARN mensajeros. En la RT-PCR se copia primero el ARN en ADNc, usando una transcriptasa inversa (RTasa), y después se le somete a PCR que amplifica el ADNc exponencialmente.

Se ha empleado el protocolo de Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Tech, USA) para obtener ADNc de las muestras que fueron analizadas posteriormente mediante RT-PCR cuantitativa:

1. Se prepara la síntesis de la primera hebra de ADNc en un tubo de microcentrifugado y se añaden los siguientes componentes en este orden:

RNAsa libre en 20 μ L de H₂O.

10 μ L de la primera hebra master-mix.

3 μ L de oligo(dT)primer.

1 μ L de AffinityScript RT/RNasa Block enzyme mixture.

1 μ g de ARN (0,3 μ g-3 μ g).

2. Incubación a 25^o C durante 5 minutos.

3. Incubación a 42^o C durante 15 minutos para permitir la síntesis del ADNc.

4. Incubación a 95^o C durante 5 minutos para terminar la reacción de síntesis del ADNc.

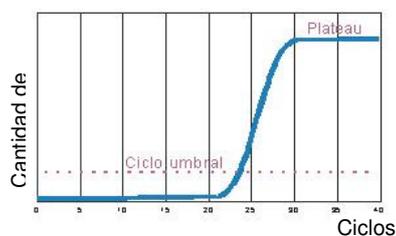
5. Para finalizar la síntesis de la primera cadena de ADNc se enfría en hielo para usar inmediatamente la PCR cuantitativa.

6. Se comprueba la calidad del ADNc y se determina su concentración utilizando el Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

PCR a tiempo real o PCR cuantitativa

La PCR a tiempo real es una técnica precisa y potente para cuantificar la cantidad de molde (ADNc) que se ha usado en una reacción de PCR. Las reacciones de PCR siguen una cinética como la de la figura 20.

Figura 20. Cinética de las reacciones de PCR.

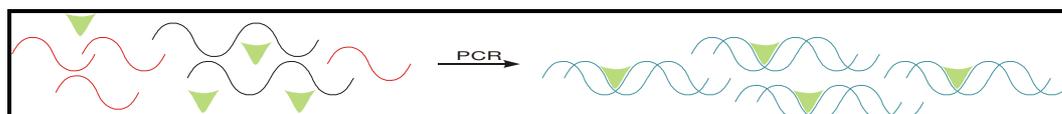


La PCR convencional analiza la cantidad de DNA presente en la muestra en el punto final de la reacción (plateau). En este momento, la cantidad de producto dependerá de la cantidad de reactivos (cebadores, dNTPs, actividad de la polimerasa) presentes en la muestra inicial pero no depende ya de la cantidad de molde inicial puesto que, la PCR es, por naturaleza, un proceso exponencial. Así, el único punto de la reacción en que la cantidad de molde determina el desarrollo de la PCR es el punto de inicio de la amplificación exponencial. Una reacción en la que haya más molde producirá más pronto (en un ciclo más temprano) la cantidad de DNA necesaria para ser detectada.

La PCR cuantitativa aprovecha el fenómeno de la fluorescencia para medir la cantidad de producto a tiempo real. El momento (ciclo) en el que una muestra empieza a ser detectada se denomina ciclo umbral o Ct, y es proporcional a la cantidad de molde de partida. El termociclador que se utiliza está acoplado a un láser y un detector, que registran el aumento de fluorescencia en el tubo. Los dos tipos de reactivos fluorescentes más extendidos son:

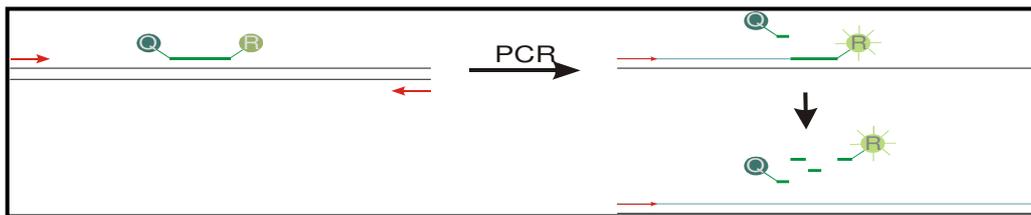
1. Agentes intercalantes: son moléculas fluorescentes que se introducen en la doble hélice de DNA con alta afinidad pero tienen una afinidad menor por las cadenas simples (Figura 21):

Figura 21. Esquema del mecanismo de acción de las sondas intercalantes.



2. Sondas tipo Taqman (Figura 21): en este caso el reactivo fluorescente es la sonda, un oligonucleótido cuya secuencia se encuentra entre la de los cebadores. Esta molécula tiene dos fluoróforos anclados, uno en cada extremo. El primero de ellos es fluorescente y el segundo es un *quencher* o “apagador” de fluorescencia. Cuando la PCR progresa, el *quencher* y el fluoróforo se separan y éste comienza a emitir fluorescencia:

Figura 22. Esquema del mecanismo de acción de las sondas Taqman.



De los dos sistemas de fluoróforos descritos, el más sensible es el sistema de sondas Taqman ya que, al controlar cuándo empieza a emitir fluorescencia da un fondo menor. La principal diferencia es que las sondas Taqman sólo se unen al gen que se quiere amplificar, permitiendo un amplificado específico. El otro método es inespecífico. Los fluoróforos más extendidos son FAM y VIC y como *quencher* se suele usar TAMRA.

La síntesis de ADNc o retro-transcripción es un paso crítico puesto que, se requiere que sea un proceso lineal (para que sea reflejo de la cantidad de RNA de partida, que había en nuestra muestra) y de una eficiencia adecuada y reproducible. Cuantificar la cantidad de ADNc, que se pone en el experimento, es difícil por lo que, se suele emplear un control con el fin de normalizar la medida obtenida por la cantidad de ADNc de partida. Es lo que se llama control endógeno. El control endógeno es un gen cuya expresión se mide en paralelo con nuestro gen problema, del que sabemos que tiene una expresión constante en nuestras muestras. No existe ningún gen conocido que se exprese de manera constante en todos los tejidos. Debido a su importancia, la determinación de este control endógeno requiere experimentos específicos para ello y ha de hacerse para cada tejido. En esta Tesis, tras diferentes pruebas se ha seleccionado el gen gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), como gen constitutivamente expresado para el control endógeno (*housekeeping gene*).

Además en este tipo de estudios conviene medir cada ADNc al menos por duplicado para comprobar la reproducibilidad dentro del experimento. Con el fin de evidenciar problemas de inhibición, que llevarían a valoraciones erróneas (a veces por la composición del

tampón de RT, una muestra más concentrada amplifica más tarde que una más diluida), se miden dos diluciones diferentes del mismo ADNc, cada una por triplicado. Si además se quieren descartar artefactos debidos a la reacción de RT, se deben medir ADNcs procedentes de síntesis diferentes.

Para cada muestra preparamos la siguiente mezcla indicada en la tabla 9:

Tabla 9. Preparación mezcla de reacción del protocolo de qRT-PCR.

Master Mix (Solaris qPCR)	12,5 μL
Solaris primer	1,25 μ L
ADNc	1 μ g
H ₂ O libre de RNAsas	Cantidad suficiente (Variable)
Volumen final	25 μ L

Las condiciones de la RT-PCR cuantitativa fueron: 15 minutos y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, con una elongación terminal a 60°C durante 1 minuto.

En la tabla 10 se presentan los 20 genes, expresados diferencialmente ($p < 0,05$) entre respondedores y no respondedores, que se analizaron mediante qRT-PCR. Además, se analizaron TP53 (tumor protein 53) y CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1a) dada su asociación con tumores colorrectales.

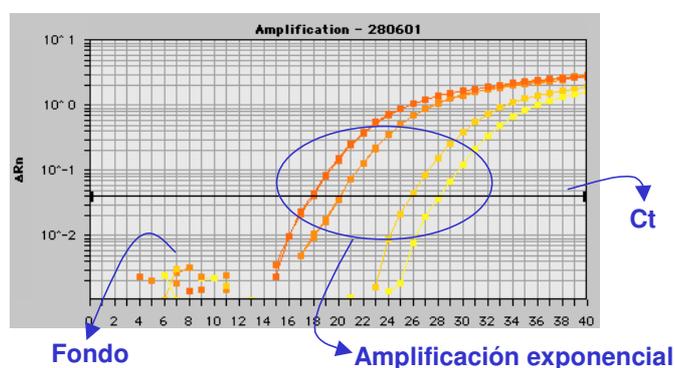
Tabla 10. Secuencia de cebadores y sondas de los 20 genes analizados por qRT-PCR. Todos los cebadores confirmaron no presentar homología con otros genes conocidos utilizando la herramienta BLAST Sequence Similarity Search.

Gen	Descripción	Tipo de sonda	Secuencia
GNG4	guanine nucleotide binding protein (g protein), gamma 4	Probe	5'-GCGGACCTCCTGGCCTA-3'
		Primer Forward	5'-AGATGGAAGCCTGTATGGAC-3'
		Primer Reverse	5'-ACGTGAGCTTCACAGTAG-3'
c-MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian), mrna	Probe	5'-AGGCTCCTGGCAAAAGGTC-3'
		Primer Forward	5'-AGCAGCGACTCTGAGGA-3'
		Primer Reverse	5'-AAGGTGATCCAGACTCTGAC-3'
MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	Probe	5'-ACATACGTGGCATTACAGTCC-3'
		Primer Forward	5'-TCCAAAGGCCGTAATGTTC-3'
		Primer Reverse	5'-TTGGTCTCCATACAGG-3'
ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	Probe	5'-AAAATTCAGGGTTGCTG-3'
		Primer Forward	5'-GGTGACATTGGTCCATCACAT-3'
		Primer Reverse	5'-TGGAGTACCTAGACTCACAG-3'
CRI2	crebbp/ep300 inhibitor 2	Probe	5'-GATAGCTCTGACTGCCTCTG-3'
		Primer Forward	5'-CAGCGTTTGATGCCGAAT-3'
		Primer Reverse	5'-GAGGGTTGATAACTTCAG-3'
NAT5	n-acetyltransferase 5 (ard1 homolog, s cerevisiae), transcript variant 2	Probe	5'-CAGTTCTGTGCCTGAGA-3'
		Primer Forward	5'-CACTGTATGTATGCTAGGGAAA-3'
		Primer Reverse	5'-ATATGCAGCAGTGGTTC-3'
CHMP4B	chromatin modifying protein 4b	Probe	5'-GTTTGACGAGGATGAGC-3'
		Primer Forward	5'-ACCTGTAGGGTTTGGAGAAG-3'
		Primer Reverse	5'-TCTAATCCGCCATGAG-3'
FAM33A	family with sequence similarity 33, member a	Probe	5'-CGAGATGTTGAGTGACAGC-3'
		Primer Forward	5'-TCATGCAGAGGGCGTTAC-3'
		Primer Reverse	5'-AGGGCCTCCATTGGACAG-3'
TOP1MT	topoisomerase (dna) i, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein	Probe	5'-ATCAGATTGCCTGGTGC-3'
		Primer Forward	5'-AGCTCAACTACCTGGAC-3'
		Primer Reverse	5'-CCCTGAACCGCTTGAC-3'
SRFBP1	serum response factor binding protein 1	Probe	5'-GAGTCATCAAAGAATGC-3'
		Primer Forward	5'-GATGTGCTAAAAGCTGCTGTA-3'
		Primer Reverse	5'-GAATGATTGTCTCTGAAGC-3'
RRM1	ribonucleotide reductase m1 polypeptide	Probe	5'-TCTATTTCAGAGCATAACC-3'
		Primer Forward	5'-TTACCGAGCGGGCCTAT-3'
		Primer Reverse	5'-CAGGTCATCAGGAATTTCTGG-3'
CD81	cd81 antigen (target of antiproliferative antibody 1	Probe	5'-GTGAAGACCTTCCACGAG-3'
		Primer Forward	5'-TGTGAAGCAGTTCTATGACCAG-3'
		Primer Reverse	5'-ACAGCAGTCAAGCGTCT-3'

Gen	Descripción	Tipo de sonda	Secuencia
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9, transcript variant 2	Probe	5'-ACTCATGCAAAGAGAGC-3'
		Primer Forward	5'-CCCAAGGGATTGTTGTGCT-3'
		Primer Reverse	5'-GGACAAGTTCACGATAAGCTC-3'
STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18, transcript variant 1	Probe	5'-TATCCAGGTGAAAGAACT-3'
		Primer Forward	5'-AGAATACACTGCCTGTCGCTTG-3'
		Primer Reverse	5'-AGGACGCTTCTCCAGTT-3'
ID1	inhibitor of dna binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein , transcript variant 2	Probe	5'-TCTACGACATGAACGGCTGT-3'
		Primer Forward	5'-CTGCTCTGTCTGAGCAGAG-3'
		Primer Reverse	5'-CCTTGAGGCGTGAGTAAC-3'
DPM1	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit	Probe	5'-TACTATTGGCGAGGTTCC-3'
		Primer Forward	5'-AAGGCTACGTCTCCAGATG-3'
		Primer Reverse	5'-CACGATCCACAAATGATATTGG-3'
STMN2	stathmin 1/oncoprotein 18 (stmn1), transcript variant 2	Probe	5'-GGAAAGAAGAAAGTCTCAGG-3'
		Primer Forward	5'-GCTGATCTTGAAGCCACCAT-3'
		Primer Reverse	5'-TTCAGCACCTGGGCCTCTG-3'
P53CSV	p53-inducible cell-survival factor	Probe	5'-GGAGAAAGAGATTCCTA-3'
		Primer Forward	5'-CCAGCAGTGTGTTCAGAAAG-3'
		Primer Reverse	5'-GAACTCCAGTCCTTCAATAGG-3'
POLA	yw15b01r1 soares_placenta_8to9weeks_2nbhp8to9w cdna clone image:252265 5' similar to gb:x60489 elongation factor 1-beta (human)	Probe	5'-ATTTGCTGGCGATGATGT-3'
		Primer Forward	5'-GAGCCTCCATTAACCTCTGT-3'
		Primer Reverse	5'-TGTACTCTCTCGACCTGTA-3'
ABC7	atp-binding cassette, sub-family b (mdr/tap), member 7, nuclear gene encoding mitochondrial protein	Probe	5'-CAGCAGTTCTGATTGGC-3'
		Primer Forward	5'-TGTAGACAGCCTCAACCAGATG-3'
		Primer Reverse	5'-GCTCTTGATACCCATAGCC-3'
TP53	tumor protein p53	Probe	5'-CCCTATGAGCCGCTGA-3'
		Primer Forward	5'-CTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAG-3'
		Primer Reverse	5'-TGGTACAGTCAGAGCCAACCTCA-3'
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1a	Probe	5'-GAACTTCGACTTTGTCACCG-3'
		Primer Forward	5'-GCGACTGTGATGCGCTAA-3'
		Primer Reverse	5'-CCTCCAGTGGTGTCTCGGT-3'

Como resultado de la qRT-PCR se obtiene una medida de fluorescencia, que se traduce en medida de cantidad. Para ello se utiliza una curva estándar, que es un conjunto de puntos en que se ponen cantidades conocidas de ADNc molde. Como la curva se mantendrá igual en los distintos experimentos, permitirá evaluar la reproducibilidad entre mismos. La curva estándar se compone de 5 puntos obtenidos de 5 diluciones seriadas (1, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500) de ADNc procedente de un ARN Referencia Humana Universal (Stratagene, Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) que está compuesto de ARN de 10 líneas celulares. La curva estándar elegida debe tener varios puntos entre los que deben amplificar todas las muestras puesto que es el único rango en el que se puede asegurar que la amplificación es lineal. Los resultados que el programa ofrece generan un gráfico (Figura 23), en el que se representa el incremento de fluorescencia en función del ciclo de amplificación. Sobre este gráfico, se fija el Ct de manera que corte todas las líneas de amplificación de todas las muestras en la parte exponencial de la curva, por encima de la señal del fondo. De este modo se establece el punto en el que el programa procesará cada amplificación para calcular la cantidad de molde.

Figura 23. Gráfico de los resultados de la RT-PCR cuantitativa. En el eje de abscisas están representados los ciclos de amplificación y en el de ordenadas la intensidad de la señal.



Con estos datos, el programa genera un fichero de informe (Experimental Report) en el que se registra cada muestra, qué tipo de muestra es, los valores de expresión fijados para la curva estándar y el valor de expresión calculado para cada muestra problema. Este fichero puede ser almacenado y procesado posteriormente en Excel, donde han de hacerse las normalizaciones. Así, para calcular el valor de expresión real de cada muestra, la expresión del gen problema hay que dividirla entre la expresión del control endógeno.

Para el análisis estadístico de los valores de expresión obtenidos tras realizar la qRT-PCR, se utilizó el programa SPSS 15.0 con la aplicación de la prueba t para muestras

independientes.

7. Cálculo de la capacidad de predicción de la firma génica

Para cada uno de los genes que se validaron mediante PCR, se calculó la capacidad de predicción de respuesta. Para ello se calcularon las curvas ROC con los resultados de sobreexpresión de los *micoarrays* para cada uno de los genes, determinándose el punto de corte, área bajo la curva, sensibilidad y especificidad. Una vez conocidos los puntos de corte, se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y exactitud de toda la firma génica. Se empleó el programa informático SPSS 15.0 (SPSS Inc. 2006).

8. Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Los estudios de hibridación in situ fluorescente (FISH) se llevaron a cabo en los laboratorios de la empresa NimGenetics (Madrid, España).

Esta técnica permite la localización de secuencias de ADN específicas sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido. Se realizó con el objetivo de comprobar si los datos de expresión referentes a la ruta de activación c-MYC se correlacionaban con la amplificación de c-MYC. Se analizaron 200 núcleos interfásicos en corte histológico incluido en parafina.

Para la detección de c-MYC se utilizó la sonda Dako Y5410 (del tipo *breakapart*). Usando solamente una sonda del tipo *breakapart* no se podría distinguir entre amplificaciones y aneuploidías ya que no tiene un centrómero que lo identifique, por eso se realizó también la hibridación in situ fluorescente del centrómero del cromosoma 8 (CEP 8) en las mismas 13 muestras parafina de cáncer de recto localmente avanzado. Para ello se empleó la sonda Dako 30-170008, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las sondas de detección dual consisten en pares de sondas marcadas en dos colores diferentes (rojo y verde), cada una de las cuales se une a una parte distinta del gen. Los patrones detectados pueden ser de dos tipos: normal y alterado.

- Patrón normal: un patrón se considera normal cuando se detectan 2 señales rojas (c-MYC distal) co-localizadas con 2 señales verdes (c-MYC proximal).

- Patrón alterado: un patrón se considera alterado cuando el número de señales rojas (c-MYC distal) co-localizadas con señales verdes (c-MYC proximal), es distinto a 2. Se ven señales fusionadas, normalmente con color amarillo.

La FISH es una técnica semicuantitativa, que se basa en el cómputo de la proporción entre señales de c-MYC y CEP8 que no se superponen en la interfase del núcleo de la lesión. Tumores con una razón c-MYC: CEP8 \geq 2:1 se consideran positivos para amplificación del gen. Las señales de c-MYC y CEP8 se analizaron por dos patólogos independientes y con experiencia. Los casos en los que no hubo consenso se revisaron en conjunto y se discutieron por los dos patólogos expertos.

8.1 Protocolo

Desarrollo

Primer día

Identificación de la muestra: se identifica con un N° de registro de acuerdo al protocolo: “Recepción, codificación, y tratamiento de muestras en la Unidad de Citogenética” de la empresa NimGenetics.

Preparación de la muestra: extensión de los cristales o preparación de los mismos si se trata de cortes de parafina. Las preparaciones se envejecen colocándolas en una placa a 90°C durante 10 minutos. Posteriormente se deshidratan pasándolas por una serie de alcoholes (70%-80%-100%) dejándolas en cada uno entre 3 y 5 minutos. Tras el último pase en el alcohol puro, se deja secar (se puede dejar en una estufa a 60°C entre 2 y 4 minutos).

Preparación de la sonda: se lleva a cabo la mezcla de la sonda con su solución de hibridación correspondiente. Cuando ya esta lista, se coloca en una placa a 96°C durante 5 minutos.

Hibridación *in situ*: Se pone la mezcla de hibridación sobre el portaobjetos, se le coloca un cubreobjetos dejando que se extienda. Después se pone en una placa a 80°C durante 2 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se sella el cristal, se cubre y se introduce en una cámara húmeda a 37°C durante toda la noche.

Segundo día

Lavado de los cristales.

- Primero se introducen los cristales en 0.4xSSC/0.3% NP-40 a 75°C durante 2 minutos.

- Segundo se meten los portaobjetos en 2xSSC/0.1% NP-40 a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Tercero, se colocan los cristales en PBD 1x a temperatura ambiente entre 2 y 4 minutos.

Finalmente, se dejan escurrir, sin que se sequen completamente y se contra-tiñen con DAPI.

Captura y análisis

Captura de imágenes. Una vez montados los cristales hibridados se procede a la captura de imágenes para su posterior análisis. Esto se hace con un microscopio epifluorescente y una cámara digital, todo ello a través de un programa informático (Cytovision). Se capturan entre 10 y 20 imágenes por caso, dependiendo de la calidad de la hibridación.

Análisis de las metafases capturadas. Se lleva a cabo con el analizador de imagen Cytovision, localizado en el laboratorio de Citogenética. Este programa genera los perfiles de CGH finales que ofrecen los patrones de pérdidas o ganancias.

9 Inmunohistoquímica.

Para saber si el aumento de los niveles de ARNm de c-MYC en los pacientes respondedores estaba asociado con un incremento de la expresión proteica de c-MYC se llevó a cabo la inmunohistoquímica (IHQ) de c-MYC.

Se utilizaron los tejidos almacenados en bloques de parafina correspondientes a 14 adenocarcinomas de recto pre-tratamiento, incluidos en el estudio de expresión, y el anticuerpo para c-MYC (Epitomics, referencia 1472-1, clon: Y69, dilución 1/50).

Para la realización de esta técnica se contó con el soporte de la Unidad de Inmunohistoquímica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

RESULTADOS

1. Características de la muestra

Se incluyeron un total de 35 pacientes pertenecientes a la población del área de referencia del HUVN (área norte de Granada) para el estudio de *microarrays*. Posteriormente, se añadieron otros 10 pacientes consecutivos, con los mismos criterios, para realizar la validación mediante qRT-PCR de los genes identificados en los estudios con *microarrays*.

De los 35 casos iniciales, se excluyeron 9 por las siguientes causas: seis de ellos (nº 5, nº 10, nº 26, nº 29, nº 30 y nº 32) al presentar discordancias entre el grado de regresión tumoral y la disminución del estadio tumoral y los otros 3 pacientes (nº 8, nº 14 y nº 23) al ser las muestras de las biopsias deficitarias.

Características de los pacientes

La muestra restante se compone de 7 mujeres (26,9%) y 19 hombres (73,1%), con una edad media de 61 años, que varía entre 36 y 83 años.

Estadio clínico antes de la neoadyuvancia

El 50% de los pacientes se encontraban en estadio clínico II de su enfermedad antes del tratamiento radioquimioterápico y el otro 50% en estadio III.

Tratamiento neoadyuvante empleado

En el 57,7% (15 pacientes) de los casos se administró capecitabina concomitante con la radioterapia. El 42,3% restante (11 pacientes) se trató con capecitabina y oxaliplatino. Todos recibieron radioterapia externa sobre la lesión tumoral, el recto, mesorrecto y adenopatías locorregionales con dosis total de 50,4 Gy en 25 fracciones de 1,8 Gy. En la tabla 11 se expone las características individuales (paciente, estadio tumoral y tipo de tratamiento).

Tabla 11. Características de los pacientes incluidos en el estudio. Nº: número de inclusión del paciente en el estudio. Sexo: M: mujer. H: hombre. Quimio: quimioterapia empleada en la neoadyuvancia. Cape: capecitabina. Capox: capecitabina+ oxaliplatino. cTN: estadificación clínica mediante pruebas de imagen. Cirugía: técnica quirúrgica empleada. RAB: resección anterior baja. AAP: amputación abdomino-perineal. HART: intervención de Hartmann. TRG: grado de regresión tumoral de Mandard. Downst: *downstaging* o disminución del estadio tumoral. Downs: *downsizing* o disminución del T. Resp: respuesta del paciente. RPC: respuesta patológica completa. En gris los pacientes del estudio con microarrays y en azul los del grupo de validación.

Nº	Sexo	Edad	Quimio	cTN	Cirugía	TRG	Downst	Downs	Resp	RPC
1	H	63	Capox	T4N1	RAB	2	SI	SI	SI	NO
2	H	71	Cape	T3N0	RAB	2	SI	SI	SI	NO
3	H	77	Cape	T3N1	RAB	4	SI	NO	NO	NO
4	H	67	Cape	T3N0	RAB	5	NO	NO	NO	NO
5	M	83	Cape	T3N0	AAP	2	SI	SI	SI	NO
6	M	63	Cape	T3N2	RAB	5	NO	SI	NO	NO
7	H	53	Capox	T3N1	RAB	1	SI	SI	SI	SI
8	H	64	Capox	T3N2	HART	2	NO	SI	SI	NO
9	H	69	Cape	T3N0	HART	3	SI	SI	NO	NO
10	H	69	Cape	T3N0	RAB	1	SI	SI	SI	SI
11	H	71	Cape	T3N0	RAB	5	SI	SI	NO	NO
12	M	62	Cape	T3N1	HART	5	SI	NO	NO	NO
13	M	58	Cape	T3N1	RAB	1	SI	SI	SI	SI
14	H	50	Capox	T4N0	AAP	4	NO	NO	NO	NO
15	H	36	Capox	T4N0	HART	5	NO	NO	NO	NO
16	H	54	Cape	T3N0	RAB	4	SI	SI	NO	NO
17	H	47	Capox	T3N0	RAB	4	NO	NO	NO	NO
18	H	45	Capox	T3N0	AAP	5	NO	NO	NO	NO
19	H	47	Capox	T3N1	HART	1	SI	SI	SI	SI
20	H	74	Cape	T3N0	HART	4	SI	SI	NO	NO
21	M	61	Cape	T3N1	RAB	4	NO	SI	NO	NO
22	M	37	Capox	T3N2	RAB	5	NO	NO	NO	NO
23	H	54	Cape	T3N0	RAB	1	SI	SI	SI	SI
24	H	69	Capox	T3N2	AAP	3	NO	NO	NO	NO
25	M	70	Cape	T3N2	RAB	3	SI	NO	NO	NO
26	H	61	Capox	T3N1	RAB	2	SI	SI	SI	NO
27	M	76	Cape	T3N0	RAB	4	SI	SI	NO	NO
28	M	64	Cape	T3N2	RAB	4	NO	NO	NO	NO
29	H	63	Cape	T3N1	RAB	2	SI	SI	SI	NO
30	M	56	Cape	T3N1	RAB	3	SI	NO	NO	NO
31	H	62	Cape	T3N1	RAB	4	NO	NO	NO	NO
32	H	64	Cape	T3N2	RAB	3	NO	NO	NO	NO
33	H	56	Cape	T4N1	RAB	3	SI	SI	NO	NO
34	H	62	Cape	T3N1	RAB	4	NO	NO	NO	NO

Tratamiento quirúrgico

La técnica quirúrgica empleada fue resección anterior baja en el 61,5% (n=16, todas ellas con ileostomía lateral de protección), amputación abdomino-perineal en 15,4% (n=4) e intervención de Hartman en el 23,1% (n=6) por incontinencia fecal previa o deseo expreso del paciente. En todos los casos se realizó escisión mesorrectal completa.

La intervención se realizó unas 8 semanas (mediana) después del tratamiento neoadyuvante, rango entre 7 y 14.

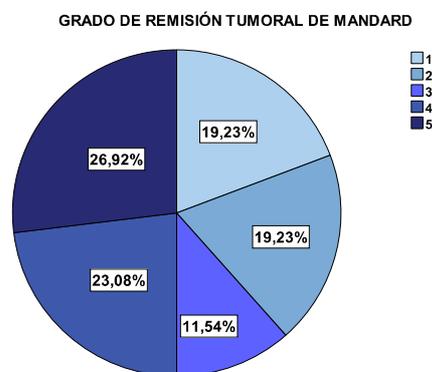
Todas las intervenciones fueron realizadas por la Sección de Coloproctología del Servicio de Cirugía General, en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

Respuesta anatomopatológica a la neoadyuvancia

El 50% de los pacientes se encontraban inicialmente en un estadio II de su enfermedad y el otro 50% en el estadio III. Diecisiete pacientes (65,4%) tuvieron una disminución del estadio tumoral y 16 (61%) una disminución del tamaño tumoral.

Diez pacientes fueron clasificados como respondedores, 38.4% (grados 1 y 2 de Mandard), y 16 (61,5%) como no respondedores (grados 3, 4 y 5) (Figura 24).

Figura 24. Respuesta anatomopatológica medida según los grados de remisión tumoral de Mandard.



Homogeneidad de la muestra

Al estratificar la muestra para los dos grupos, respondedores y no respondedores, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en edad, sexo, quimioterapia administrada y tipo de cirugía (ver Tabla 12), siendo por lo tanto ambos grupos homogéneos.

Tabla 12. Características (pacientes y tratamiento) del grupo con respuesta y no respuesta.

	No respuesta 16 (61.5%)	Respuesta 10(38.4%)	p
Quimioterapia			0,434
Capecitabina	17 (73,9%)	6(54,5%)	
Capecitabina+ oxaliplatino	6 (26,1%)	5 (45,5%)	
Sexo			0,437
Mujer	8 (34,8%)	2 (18,2%)	
Varón	15 (65,2%)	9 (81,8%)	
Técnica quirúrgica			1,000
Resección anterior	20 (87%)	10 (90,9%)	
Amputación abdomino-perineal	3 (13%)	1 (9,1%)	
Edad (media \pm desviación estándar)	60,5 \pm 11,4	63,2 \pm 9,9	0,526

Análisis de supervivencia

La media de seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio fue de 42 meses (rango entre 32 y 52 meses). A los 3 años, la supervivencia libre de enfermedad fue de un 69,2% y la supervivencia global de un 83,6% (Figura 25). Si estratificamos la muestra de acuerdo a la respuesta al tratamiento no se observan diferencias estadísticamente significativas, quizás atribuible al bajo número de pacientes (Figura 26), siendo la supervivencia global a los 3 años de 80% para los respondedores y 86% para los no respondedores y la supervivencia libre de enfermedad de 70% y 68% respectivamente.

Figura 25. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes incluidos en el estudio.

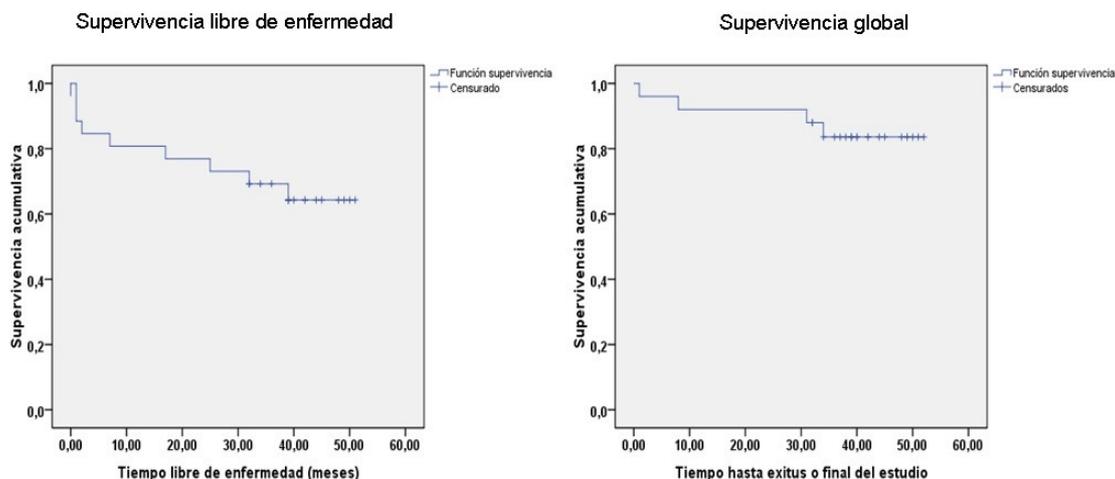
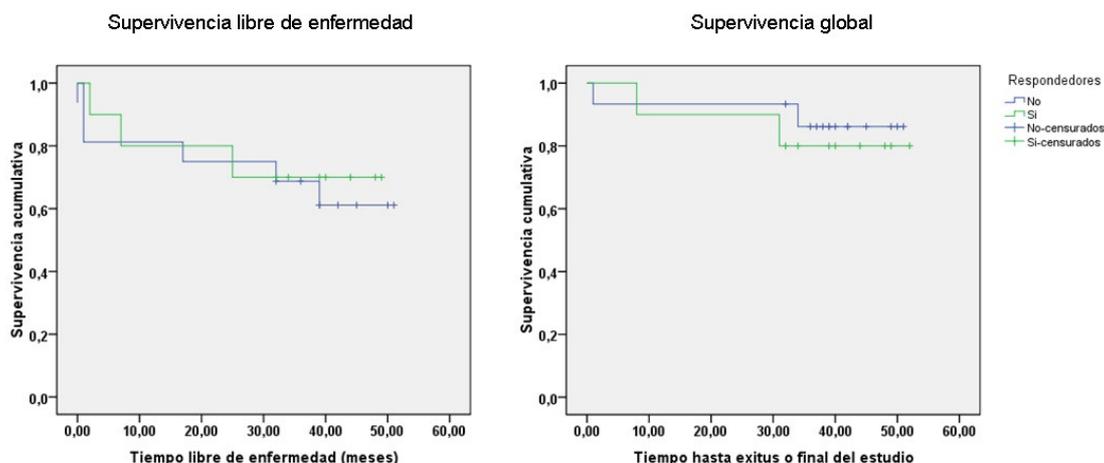


Figura 26. Comparación de la supervivencia libre de enfermedad según su respuesta al tratamiento.

2. Resultados de los perfiles de expresión genética en la muestra

2.1 Genes expresados diferencialmente entre el grupo con respuesta y no respuesta

Para obtener los perfiles de expresión génica de las 26 biopsias de adenocarcinoma de recto en estadio localmente avanzado se hibridó el material genético extraído de muestras de tejido tumoral por duplicado en los *microarrays* de genoma completo humano de la plataforma CodeLink® (Applied Microarrays, AZ, USA).

A modo de síntesis, se obtuvieron muestras de tejido tumoral antes de la neoadyuvancia de cada uno de los pacientes participantes en el estudio, procesándose y analizándose tal como se ha descrito previamente en Material y Métodos (extracción, marcaje e hibridación de *microarrays*). Una vez leídos los *microarrays* en el escáner de lectura GenePix 4000B (Axon Instruments, USA) se obtuvieron los datos globales de la expresión génica. Posteriormente, se realizó la normalización mediante por el programa informático CodeLink Expression Analysis v5.0 (Applied Microarrays, Tempe, AZ USA) que reduce la posible variabilidad debida a la técnica, dejando la variabilidad biológica.

Una vez que se homogeneizaron los datos, se procedió a realizar el análisis de significación de *microarrays* (SAM) para determinar los genes que se expresaban de forma diferente en el grupo de respondedores (10 pacientes) frente a los no respondedores (16 pacientes), ajustando el valor *delta* para obtener una tasa de falsos positivos acorde con la

precisión buscada. También se calcularon los niveles de expresión de estos genes, es decir el número de veces (*fold*) que están sobre-expresados en los pacientes respondedores con respecto a los no-respondedores.

Se identificaron un total de 260 clones que se corresponden con 257 genes (ANEXO 2) cuya expresión es distinta y significativa (p ajustada $< 0,05$) entre los dos grupos (respondedores y no respondedores). Es interesante destacar, que estos genes presentan niveles de expresión mayores en las muestras de pacientes respondedores.

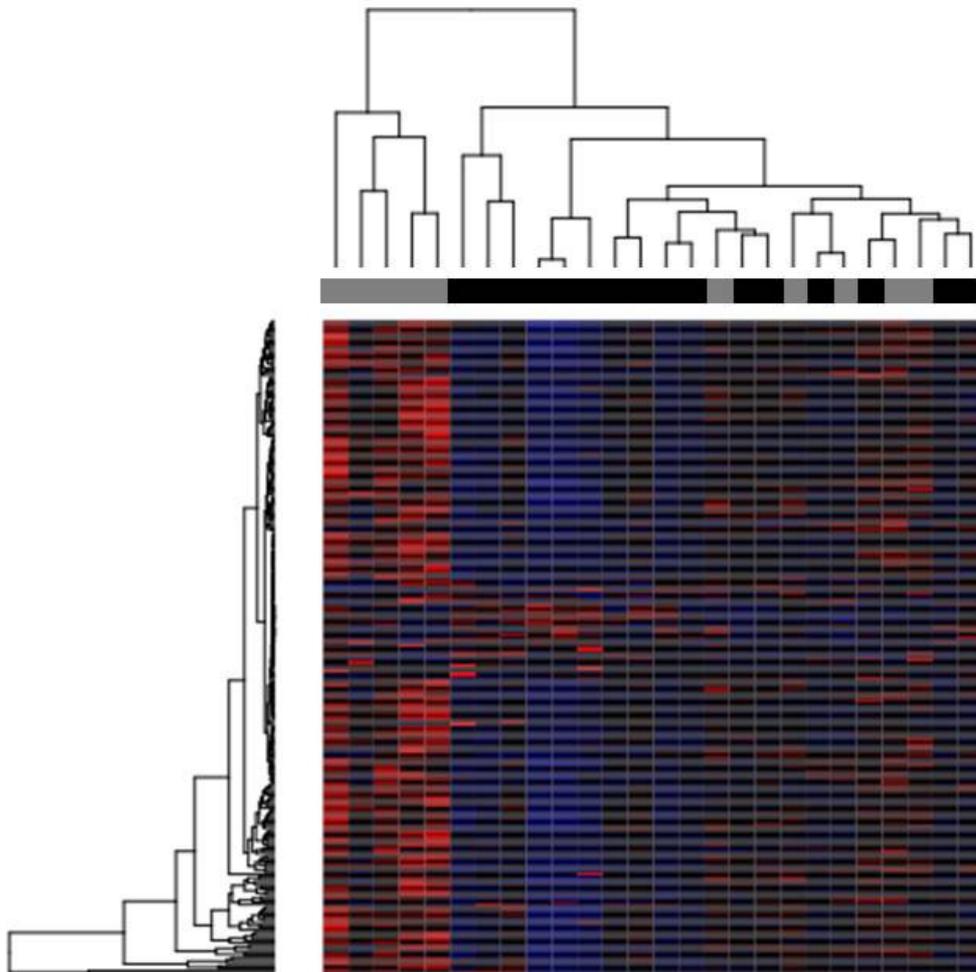
En general, el cálculo de las veces (*fold*) que se encuentran sobre-expresados estos 257 genes en los pacientes respondedores con respecto a los no respondedores no presentó grandes variaciones, oscilando entre 1,78 de ECT2 y 0,311 de MFDC12. Sin embargo, 5 genes (c-MYC, GNG4, MMP12, HSPCP1 y STARD7) presentaron un *fold* mayor o igual a 1,95 (véase Tabla 13).

Tabla 13. Nombre del gen, número de veces (*fold*) que está sobre-expresado el gen en los respondedores respecto a los no respondedores y número de identificación de secuencia del GenBank, NCBI, (CodeLink ID).

Nombre del gen	Fold	CodeLink ID
GNG4	3,002	NM_004485.2
c-MYC	2,984	NM_002467.3
MMP12	2,301	NM_002426.1
HSPCP1	2,218	BQ431029.1
STARD7	2,005	NM_139267.1
GEMIN5	1,956	NM_015465.1

Tras el análisis estadístico se realizó el agrupamiento de los datos en un dendrograma. El perfil de expresión conseguido utilizando estos 257 genes proporciona básicamente la separación de respondedores y no respondedores en función del patrón de expresión de estos genes (Figura 27). En el dendrograma se pueden ver los genes sobre-expresados en color rojo y los reprimidos en color azul. Cada columna corresponde a un gen y cada fila a un paciente. Se ven dos ramas principales. En la primera se agrupan 5 pacientes respondedores que muestran una gran sobreexpresión de los genes (predominio del color rojo). La otra rama es más heterogénea y con más ramificaciones, agrupando los no respondedores y el resto de los respondedores (predominio de color azul). Las múltiples ramificaciones reflejan la heterogeneidad genética de estos tumores.

Figura 27. Agrupamiento en dendrograma de los 257 genes expresados de forma diferente y significativa ($p < 0,05$) entre los pacientes con cáncer de recto localmente avanzado respondedores versus los no respondedores. Cada fila corresponde a un gen y cada columna a un paciente. Los genes sobre-expresados aparecen en color rojo y los reprimidos en azul. Las bandas de color gris representan los pacientes respondedores y las negras los no respondedores.



Entre los 257 genes que diferenciaban los pacientes con cáncer de recto localmente avanzado respondedores versus los no respondedores, distinguimos genes implicados en importantes funciones celulares, tales como ciclo celular, apoptosis, transducción de señales, etc. A continuación se resumen algunos de los más destacados:

GNG4 (guanine nucleotide-binding protein, gamma-4): codifica la subunidad gamma-4 de una proteína de membrana que regula el flujo de información desde los receptores de superficie celular a varias acciones metabólicas del interior celular¹⁴¹.

c-MYC: es un protooncogén que codifica un factor de unión al ADN que puede activar o reprimir la transcripción. A través de este mecanismo, regula la expresión de varios genes que controlan importantes funciones celulares como el crecimiento o la progresión. Es un gen

crítico en la replicación del ADN. La alteración de este gen resulta en varios cambios celulares que actúan como promotoras de la oncogénesis¹⁴².

MMP12 (matrix metalloproteinase 12): gen que codifica la metaloproteínasa 12. Las metaloproteinasas son una familia de enzimas importantes en la remodelación de los tejidos y en su reparación. La alteración de su expresión se asocia a enfermedades como invasión tumoral, artritis, aterosclerosis, aneurisma de aorta abdominal, etc^{143, 144}. Es de destacar que otros miembros de esta familia también se han relacionado con la respuesta a la radioquimioterapia, como la MMP7, MMP14, MMP9, MMP1 y MMP16^{145, 146}.

GEMIN5 (Gem (nuclear organelle) associated protein 5): codifica una proteína que es una parte de un gran complejo macromolecular localizado tanto en el citoplasma como en el núcleo y que juega un papel en el ensamblaje de pequeñas ribonucleoproteínas del núcleo (snRNPs)¹⁴⁷.

RRM1 (Ribonucleotide reductase, M1 subunit): este gen codifica la subunidad grande (R1) de la ribonucleotido reductasa. En las células en división, la ribonucleotido reductasa es esencial para la producción de desoxirribonucleótidos antes de la síntesis del ADN en la fase S. Ninguna de las dos subunidades de esta encima se encuentran en las células quiescentes, sin embargo se puede detectar durante todo el ciclo de división celular¹⁴⁸.

ID1 (Inhibitor of DNA binding 1): las proteínas ID regulan la transcripción en diferentes tipos celulares. Se ha demostrado que contribuyen al crecimiento celular, diferenciación, senescencia y angiogénesis¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

ECT2 (Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene): es una proteína transformadora que interactúa con otras proteínas Rho-like de la superfamilia RAS. Actúa como oncogen¹⁵².

2.2 Estudio de las vías metabólicas en las que participan los genes diferencialmente expresados entre respondedores y no respondedores

A continuación, se quiso determinar si había disparidades en la distribución de las funciones de los genes que diferenciaban los respondedores de los no respondedores, respecto a la distribución de todos los genes incluidos en el programa IPA. IPA permite comparar las funciones de los genes presentes en dos listas distintas: La lista “referencia” (propia de IPA) y la lista “problema”, que contiene, en este caso, los 257 genes. Este dato indicaría si genes con una función concreta están más representados en la lista de 257 genes.

Tras este análisis se comprobó que los genes implicados en el metabolismo de las pirimidinas estaban ($p=0,022$) más representados en el grupo de los 257 genes. También la categoría de enfermedades y funciones moleculares mostró diferencias significativas, indicando que es en estos procesos biológicos donde residen las principales disparidades existentes entre respondedores y no respondedores.

Entre las distintas opciones que genera el programa IPA para clasificar los genes (funciones biológicas, enfermedades, rutas) se identificaron ($p<0,05$):

- Funciones biológicas: metabolismo de pirimidinas ($p=0,022$, 5/231 genes) y purinas ($p=0,011$, 5/439 genes), señalización de metástasis de cáncer colorrectal ($p=0,02$, 2/254 genes).
- Enfermedades y funciones moleculares: en enfermedades, desórdenes y función molecular y celular, muchos de estos genes estaban relacionados con cáncer ($p<0,001$, 33 genes) y con proliferación y crecimiento celular ($p<0,001$, 19 genes).

El programa IPA también se utilizó para construir una red que interrelacionara los 257 genes. La red de interconexión más importante señalada por esta aplicación incluía 49 genes (Tabla 14), entre los que destacaban 24 genes que estaban en relación directa o indirecta con c-MYC (Figura 28).

Figura 28. Ruta de c-MYC propuesta por el programa IPA, interrelacionado con 24 genes identificados en este estudio (en rosado). Las flechas continuas indican estimulación, las discontinuas inhibición. Las distintas formas se corresponden con diferentes tipos de proteínas como se ve en el recuadro superior.

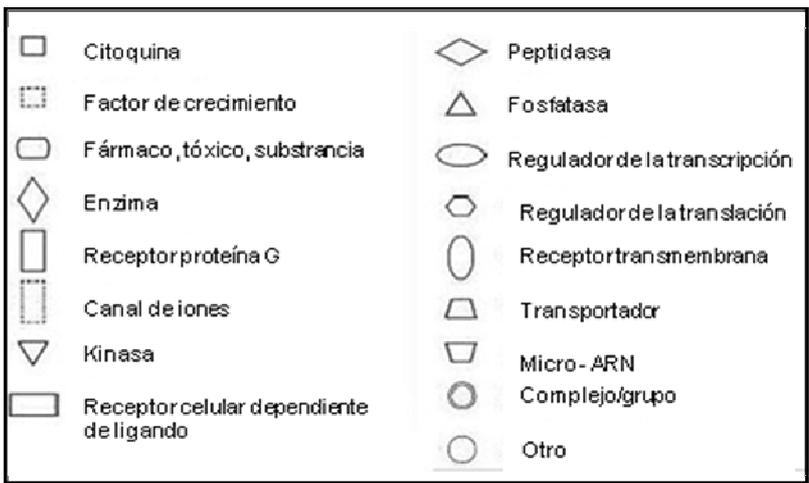
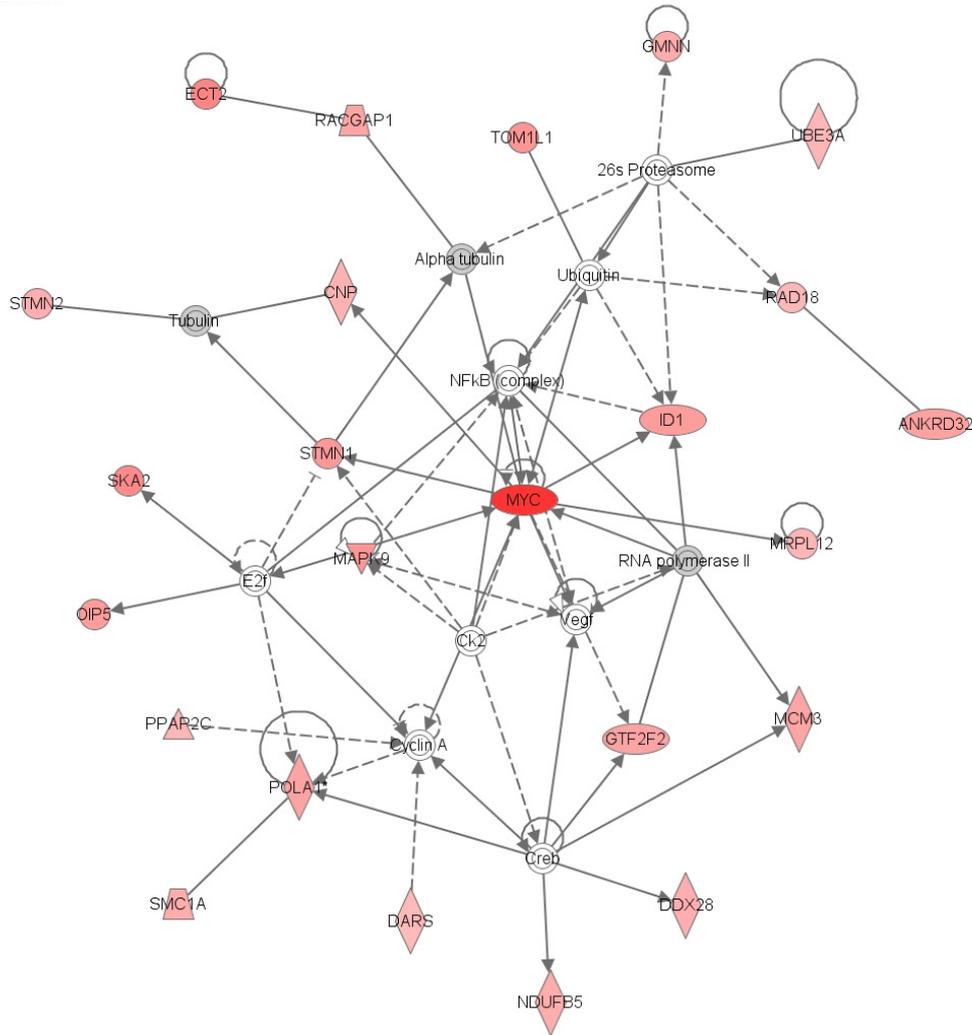


Tabla 14. Genes que el programa IPA demostró relacionados con c-MYC.

Nombre del gen	Descripción	CodeLink ID
NKRD32		descatalogado
CNP	PM0-NN0046-040400-001-a07 NN0046 Homo sapiens cDNA	AM896213.1
DARS	aspartyl-tRNA synthetase (DARS)	NM_001349.2
DDX28	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28 (DDX28), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_018380.2
ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene (ECT2)	NM_018098.4
GMNN	geminin, DNA replication inhibitor (GMNN)	NM_015895.3
GTF2F2	general transcription factor IIF, polypeptide 2 (30kD subunit) (GTF2F2)	NM_004128.1
ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein (ID1), transcript variant 2	NM_181353.1
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9), transcript variant 2	NM_139068.1
MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S cerevisiae) (MCM3)	NM_002388.3
MRPL12	mitochondrial ribosomal protein L12 (MRPL12), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_002949.2
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC), mRNA	NM_002467.3
NDUFB5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, 16kDa (NDUFB5), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_002492.2
OIP5	Opa interacting protein 5 (OIP5)	NM_007280.1
POLA	yM15b01r1 Soares_placenta_8to9Meeks_2NbHP8to9M cDNA clone IMAGE:252265 5' similar to gb:X60489 ELONGATION FACTOR 1-BETA (HUMAN);	H87655.1
PPAP2C	phosphatidic acid phosphatase type 2C (PPAP2C), transcript variant 2	NM_177526.1
RACGAP1	GTPase-ACTIVATING PROTEIN, RAC, 1	ST-M72501
RAD18	RAD18 homolog (S cerevisiae) (RAD18)	NM_020165.2
SKA2	family Mith sequence similarity 33, member A (FAM33A)	NM_182620.1
SMC1L1	KIAA0178 mRNA	D80000.2
STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18 (STMN1), transcript variant 2	NM_203399.1
STMN2	cDNA FLJ34868 fis, clone NT2NE2014525, highly similar to SCG10 PROTEIN	AK092187.1
TOM1L1	target of myb1-like 1 (chicken) (TOM1L1)	NM_005486.1
UBE3A	ubiquitin protein ligase E3A (human papilloma virus E6-associated protein, Angelman syndrome) (UBE3A), transcript variant 2	NM_000462.2

2.3 Validación mediante RT-PCR cuantitativa

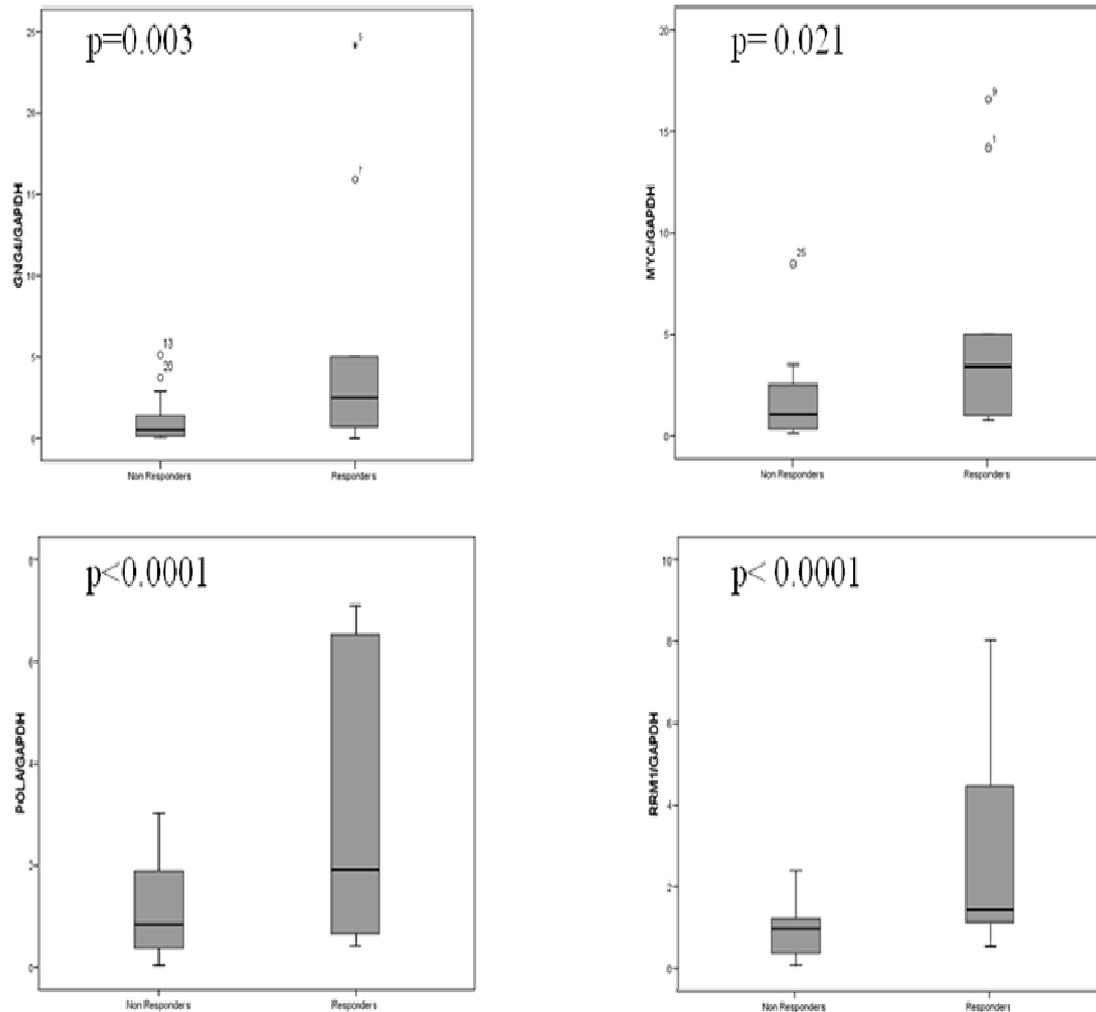
Se validaron 20 de los 257 genes expresados diferencial y significativamente ($p < 0,05$) entre respondedores y no respondedores usando la técnica denominada RT-PCR cuantitativa a tiempo real, con la finalidad de confirmar por otra técnica distinta los datos de expresión obtenidos de los *microarrays*.

Para la validación se extrajeron muestras de los 34 pacientes con cáncer de recto localmente avanzado que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión mencionados en el apartado Material y Métodos. De estas muestras sólo en 24 se pudo extraer suficiente ARNm para realizar la validación: 10 respondedores y 14 no respondedores.

Se escogieron para la validación los genes que mejor diferenciaban los dos subgrupos (respondedores versus no respondedores) y cuya función biológica se consideró interesante: ABCB7, CD81, CHMP4B, CRI2, ECT2, FAM33A (SKA2), GNG4, ID1, MMP12, MYC, NAT5, RRM1, RFSBP1, STMN1, STMN2, TOP1MT, MAPK9, TRIAP1 (P53CSV), DPM1, y POLA1. Además, se analizaron TP53 (tumor protein 53) y CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1a) dada su asociación con tumores colorrectales.

Los resultados obtenidos fueron concordantes con los de los de la técnica de *microarrays* y confirmaron una expresión diferencial entre los dos subgrupos de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado: respondedores y no respondedores. Las diferencias de expresión fueron estadísticamente significativas para los siguientes genes (Figura 29): c-MYC ($p = 0,021$), GNG4 ($p = 0,003$), POLA ($p < 0,0001$) y RRM1 ($p < 0,0001$).

Figura 29. Diagramas de cajas y bigotes que representan los valores de expresión mediante qRT-PCR de los genes c-MYC, GNG4, POLA y RRM1, cuya diferencia ha sido estadísticamente significativa en los dos grupos: respondedores y no respondedores). Las cajas representan los cuartiles 25-75, la media está representada por la línea negra, los círculos ($^{\circ}$) indican los valores atípicos y el asterisco (*) los valores extremos.



3. Valor predictivo

3.1 Curvas ROC de c-MYC, GNG4, POLA Y RRM1

Para evaluar la capacidad diagnóstica de cada uno de los genes diferencialmente expresados entre respondedores y no respondedores que se validaron mediante qRT-PCR cuantitativa, se realizaron curvas ROC, calculándose el punto de corte así como el área bajo la curva, sensibilidad y especificidad (ver tabla 15 y Figuras 30 y 31).

Tabla 15. Puntos de corte, área bajo la curva, sensibilidad y especificidad para los *microarrays* de cada uno de los genes validados mediante PCR.

Gen	Punto de corte	Área bajo la curva	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
c-MYC	64,45	0,862	70	100
GNG4	5,59	0,750	70	81,3
POLA	167,64	0,850	60	87,5
RRM1	5,52	0,806	60	75

Figura 30. Curvas ROC de c-MYC y RRM1. La capacidad de predicción de respuesta es mejor cuánto más se aleje de la línea de referencia (verde), siendo mayor el área bajo la curva, con mayor sensibilidad y especificidad (y por tanto menor 1-Especificidad).

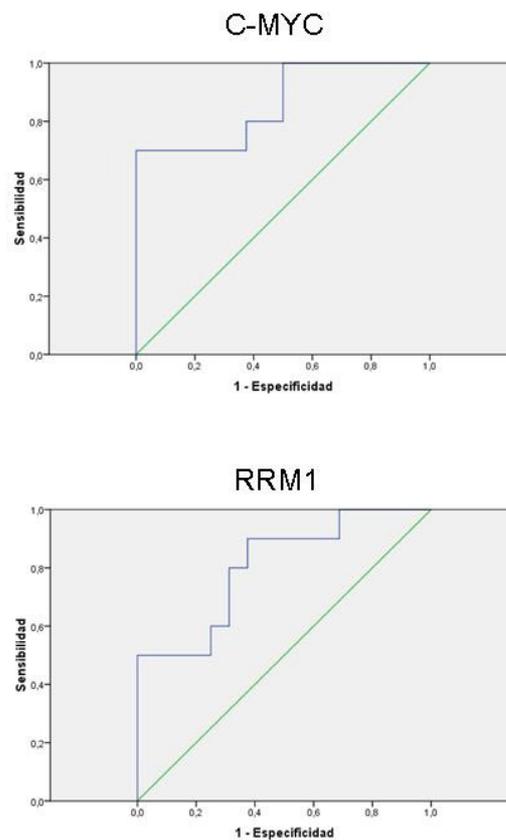
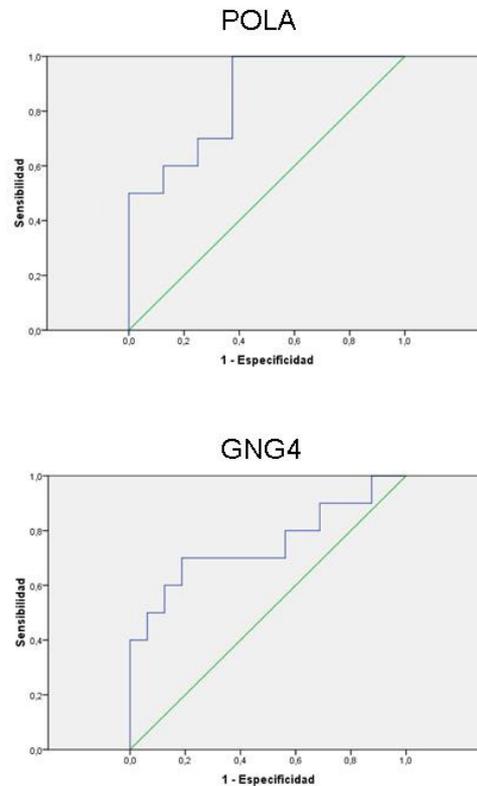


Figura 31. Curvas ROC de POLA y GNG4. La capacidad de predicción de respuesta es mejor cuanto más se aleje de la línea de referencia (amarillo), siendo mayor el área bajo la curva, con mayor sensibilidad y especificidad (y por tanto menor 1-Especificidad).



3.2 Capacidad predictiva (valor predictivo positivo) de la firma génica

Se determinó la capacidad que tiene el conjunto de genes validados (c-MYC, GNG4, POLA y RRM1) para predecir la respuesta a la radioquimioterapia en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado. Si consideramos que el test sale positivo cuando hay al menos 3 genes sobreexpresados (ARNm), tiene una sensibilidad de un 60%, especificidad de un 100%, valor predictivo positivo de un 100%, valor predictivo negativo de un 80% y una exactitud de un 85% para identificar los pacientes respondedores.

4. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Para conocer si los datos de expresión referentes a la ruta de activación c-MYC se correlacionan con la amplificación de c-MYC, se llevó a cabo un estudio de citogenética molecular mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) sobre núcleos interfásicos en

corte histológico incluido en parafina. Para la detección de c-MYC se empleó la sonda Dako Y5410 (del tipo *breackapart*) y se identificó también el centrómero del cromosoma 8 (con la sonda Dako 30-170008) con el fin de distinguir entre amplificaciones y aneuploidías.

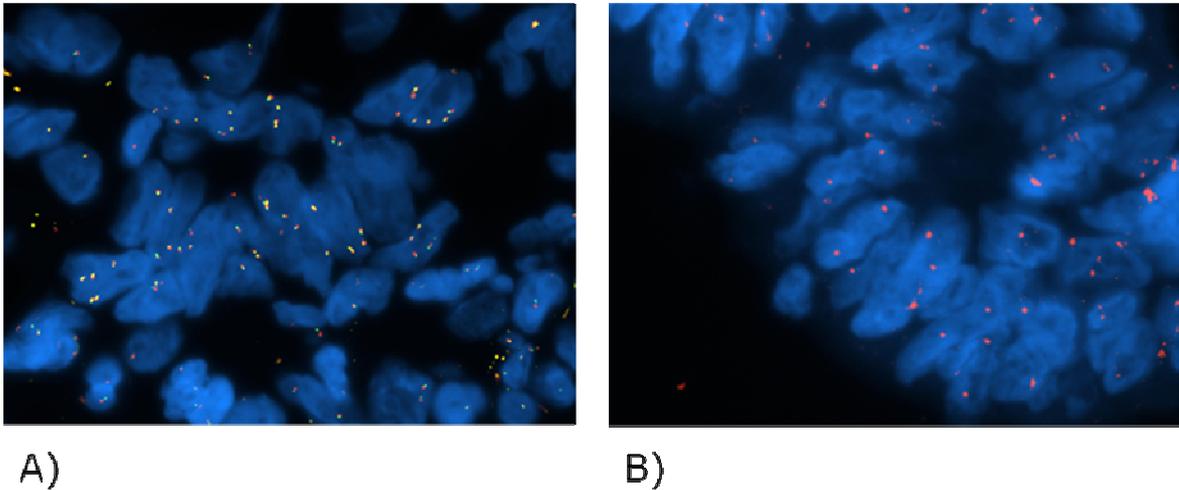
Se incluyeron para ello 13 muestras parafinadas extraídas antes de la neoyuvancia de pacientes con adenocarcinoma de recto. Los resultados, incluidos las características de los pacientes y tumores, se exponen en la tabla 16, muestran que c-MYC no estaría amplificado en los tumores de los pacientes respondedores, que presentan niveles de ARNm de c-MYC elevados. La activación de c-MYC se debería a otro mecanismo distinto a la amplificación. En la figura 32 se pueden ver dos ejemplos de FISH de c-Myc en pacientes afectos de cancer de recto

Tabla 16. Resultados obtenidos del FISH de c-MYC y CEP8 en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.

Nº paciente	Respuesta tumoral	Patrones observados	Nº señales detectadas en patrón alterado	Reordenamiento para el gen c-MYC	Nº señales de Cep8
20	NR	normal	-		
13	R	normal	-		
3	NR	normal	-		
10	R	normal	-		
6	NR	normal	-		
17	NR	normal	-		
25	NR	normal	-		
23	R	normal	-		
7	R	normal	-	Negativo , con un patrón compatible con la presencia de 3-4 copias del gen c-MYC	2
		alterado	3-4		2
5	R	normal	-	Negativo , con un patrón compatible con la presencia de 4-6 copias del gen c-MYC	2
		alterado	4-6		2
18	R	normal	-	Negativo , con un patrón compatible con la presencia de 3 copias del gen c-MYC	2
		alterado	3		2
19	R	normal	-	Negativo , con un patrón compatible con la presencia de 1 copia del gen c-MYC	2
		alterado	1		2
12	NR	normal	-	Negativo , con un patrón compatible con la presencia de 1 copia del gen c-MYC	2
		alterado	1		2

NR: no respondedor
R: respondedor

Figura 32. Análisis mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) usando sondas c-MYC break-apart y CEP8 en muestras de tejido de adenocarcinoma de recto localmente avanzado. A) Muestra con marcaje para c-MYC en la que se observan 3-4 copias de c-MYC por núcleo. B) Muestra con marcaje para CEP8, en el que se observan dos copias por núcleo de esta sonda y por lo tanto del centrómero 8, descartando así la amplificación.



5. Inmunohistoquímica: expresión proteica de c-MYC

Para conocer si las discrepancias en los niveles de expresión se correlacionaban con diferencias a nivel proteico, se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico de la proteína c-MYC.

La proteína c-Myc actúa como un factor de adhesión al ADN que puede activar o reprimir la transcripción. Actúa como mediador de numerosas señales mitogénicas y está involucrado en los procesos de proliferación celular a través de la formación de complejos heterodiméricos con la proteína Max, que es otro de los genes sobre-expresados en los pacientes respondedores versus los no respondedores. Asimismo, la translocación cromosómica de c-MYC, que implica a los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (t(8;14) y t(2;8)), se ha relacionado con los linfomas de Burkitt. La sobre-expresión de la oncoproteína c-MYC dificulta la diferenciación y favorece la proliferación celular.

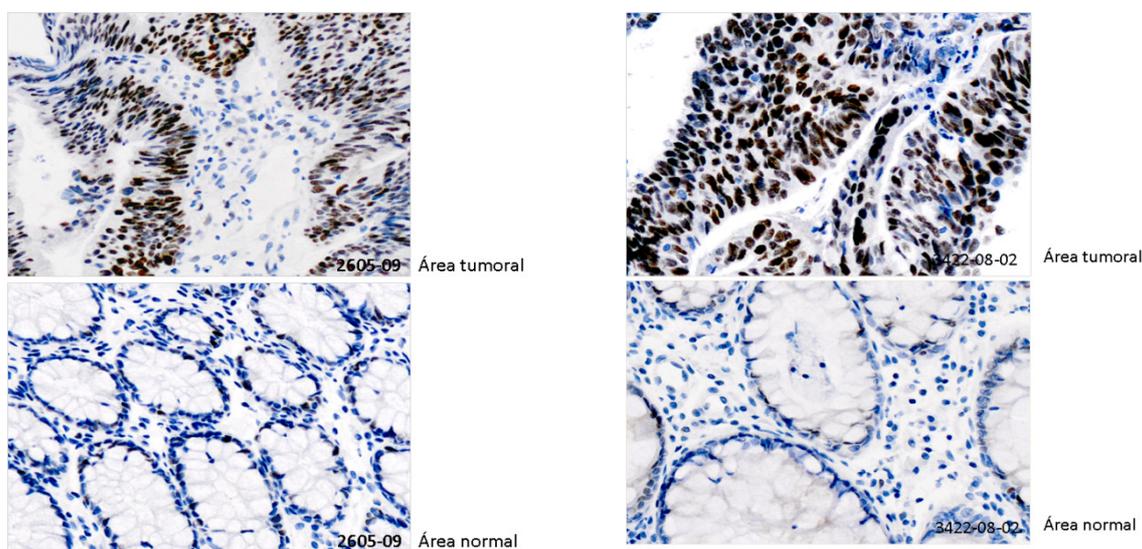
Al igual que con la FISH, sólo se obtuvieron 13 muestras de adenocarcinoma de recto de biopsias de endoscopias previas al inicio de la neoadyuvancia. De estas muestras hubo 12 resultados válidos (Tabla 17).

Los casos con sobre-expresión de la proteína c-MYC se caracterizaron por una tinción nuclear. El 100% de las muestras de adenocarcinomas de recto presentaban un elevado número de células tumorales positivas (>90%) para la proteína c-MYC, independientemente de su respuesta al tratamiento y no se detectó esta proteína en ninguna de las muestras de tejido sano (Figura 33). Por lo tanto, la tinción inmunohistoquímica de c-MYC en muestras de tejido tumoral en el momento del diagnóstico no nos sirve para predecir la respuesta.

Tabla 17. Resultados de la expresión de proteína c-MYC mediante inmunohistoquímica.

Código	IHC c-Myc	Respuesta al tratamiento
2605/09	Nuclear, >90 % tumorales	TRG4
7138/08	Nuclear, >90 % tumorales	TRG5
11842/08	Nuclear, >90 % tumorales	TRG3
11843/08	Nuclear, >90 % tumorales	TRG1
5038/09	Nuclear, >90 % tumorales	TRG1
877/09	Nuclear, >90 % tumorales	TRG1
5803/10	Nuclear, >90 % tumorales	TRG3
3422/08-2	Nuclear, >90 % tumorales	TRG4
6058/08-1	No tumor	TRG1
877/09-1	Nuclear, >90 % tumorales	TRG1
5396/08	Nuclear, >90 % tumorales	TRG1
2556/09	Nuclear, >90 % tumorales	TRG4
9536/08	Nuclear, >90 % tumorales	TRG2

Figura 33. Expresión inmunohistoquímica de la proteína c-MYC en muestras de tejido tumoral y sano. Se ve aumento de la proteína en tejido tumoral y ausencia de la misma en tejido sano.



DISCUSIÓN

Siendo la cirugía el tratamiento más eficaz en el cáncer de recto, la radioquimioterapia preoperatoria desempeña un papel básico en el manejo de los tumores localmente avanzados, consiguiendo mejorar el control local de la enfermedad frente a la cirugía, bien sola o asociada a la radioquimioterapia postoperatoria. Más aún, aquellos pacientes que tienen una respuesta completa o casi completa a la neoadyuvancia han demostrado beneficiarse de un mejor pronóstico a largo plazo¹⁵³⁻¹⁵⁵ además de presentar una mayor tasa de preservación de esfínteres¹⁵⁶. Por estas razones, la radioquimioterapia preoperatoria o neoadyuvante ha sido incorporada a los protocolos multidisciplinares de tratamiento de las neoplasias de recto en estadio localmente avanzado. Pese a estas claras ventajas, sólo un pequeño porcentaje de pacientes (20-40%) muestran una buena respuesta al tratamiento y para complicar aun mas este hecho, no existe actualmente ninguna prueba diagnóstica fiable que nos permita identificar qué pacientes han tenido una buena respuesta y mucho menos una prueba que pueda predecirla durante o antes de su aplicación. Asimismo, el tratamiento neoadyuvante, sobretudo la radioterapia, no está exento de efectos adversos como incontinencia fecal, lesiones nerviosas, complicaciones sépticas, entre otras, que sería deseable evitar precisamente en los pacientes no respondedores, así como ser capaces de poder ofrecerles una alternativa terapéutica dentro del concepto de lo que se ha denominado medicina individualizada.

En este contexto de medicina individualizada es importante indicar que ya existen plataformas diagnósticas con *microarrays* perfectamente aceptadas en la práctica clínica, como el test para la determinación del riesgo de desarrollar metástasis en pacientes con cáncer de mama (Mammaprint®) o de recurrencia (Oncotype DX®) que está siendo utilizada en la práctica diaria¹⁵⁷⁻¹⁶².

Otra plataforma patentada de *microarrays* es la ColoPrint®, utilizada para predecir el riesgo de desarrollar metástasis a distancia en los cánceres de colon en estadio II. Recientemente ha sido publicado un artículo cuyo objetivo es validarla como otra herramienta más a la hora de determinar el pronóstico e identificar pacientes que se pudieran beneficiar del tratamiento quimioterápico¹⁶³.

En este vanguardista contexto, surge el presente estudio, cuyo objetivo es la identificación de posibles genes predictores de respuesta al tratamiento neoadyuvante en pacientes con adenocarcinoma de recto localmente avanzado mediante la tecnología de *microarrays*. Para ello se tomaron biopsias de tejido tumoral antes de iniciar la neoadyuvancia y se estableció el perfil de expresión genética de las mismas. Los pacientes recibieron radioquimioterapia durante 5 semanas (50,4 Gy en 28 fracciones de 1,8 asociado a capecitabina o capecitabina y oxaliplatino), seguido de un período de latencia de 8 semanas.

Posteriormente, se intervinieron mediante la técnica habitual de escisión mesorrectal completa. La respuesta al tratamiento se evaluó mediante los grados de remisión tumoral de Mandard en la pieza quirúrgica, clasificándose como sujetos respondedores los grados 1 y 2 y como no respondedores los grados 3-4-5. Además se evaluó de forma complementaria el cambio del estadio UICC (conceptos anglosajones de downsizing y downstaging).

Cuando se estratificaron los pacientes en dos subgrupos (respondedores y no respondedores) se pudo comprobar que eran homogéneos para edad, sexo, tratamiento administrado y técnica quirúrgica y, por tanto, comparables, eliminando errores que pudiesen confundir los resultados. En la muestra analizada un 38% de los pacientes respondieron al tratamiento, siendo la respuesta patológica completa del 19%, similar a la que se encuentra en la bibliografía, que varía entre un 8 y un 31%^{71, 79, 88}.

Se determinó un grupo de genes cuya sobreexpresión se asoció a una buena respuesta a la neoadyuvancia, permitiendo diferenciar los dos grupos (respondedores y no respondedores). Atendiendo a esta primera aproximación, los pacientes no respondedores aparecen como un grupo relativamente homogéneo, comparados con los respondedores, al aparecer distribuidos bajo una misma rama en el dendrograma, pese a presentar ésta múltiples ramificaciones.

Al cotejar las funciones de éste perfil genético con las funciones de los genes incluidos en el programa IPA se objetivó su vinculación sobre todo con la ruta de c-MYC, metabolismo de las pirimidinas y señalización celular o con la proliferación y crecimiento celular. Probablemente estos procesos biológicos son la clave dónde residen las discrepancias genéticas entre los dos grupos de pacientes.

Al anotar la localización cromosómica de los 257 genes se comprobó que había 8 que se localizaban, al igual que c-MYC, en el brazo largo del cromosoma 8. Los datos de fluorescencia in situ (FISH) demostraron que los pacientes respondedores, con sobre-expresión de ARNm de c-MYC, tenían un número normal de copias del gen a nivel del ADN. Esto hace suponer que la activación de c-MYC en los tumores respondedores puede ocurrir por mecanismos independientes de la amplificación, como son las translocaciones¹⁶⁴ o mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos¹⁶⁵. El mecanismo preciso no ha sido identificado aun.

Para ir más allá y comprobar si la sobreexpresión de c-MYC en los pacientes respondedores frente a los no respondedores se correspondía con los niveles proteicos, se determinó la presencia de esta proteína en biopsias de tejido tumoral mediante inmunohistoquímica. Otros estudios han demostrado la importancia diagnóstica del análisis inmunohistoquímico para la determinación de c-MYC en cáncer de recto¹⁶⁶. De acuerdo al dogma central de la biología, se asume normalmente que las muestras con niveles altos de

ARN tienen a su vez niveles elevados de la proteína por éste codificada. Sin embargo, esto no tiene que ser necesariamente así, ya que existen controles postranscripcionales y postranslacionales. En el presente estudio, sorprendentemente, todos los tumores, respondedores o no, demostraron tener sobreexpresada la proteína c-MYC a nivel del núcleo celular. De esta manera, ninguna de estas dos pruebas pueden servir en la práctica clínica para seleccionar pacientes previo al tratamiento neoadyuvante. Un dato interesante es que en la inmunohistoquímica todas las muestras de tumor sobre-expresaban proteína c-MYC, mientras que estaba ausente en las muestras de tejido normal. Podría así comportarse como un marcador de malignidad.

Aunque el mecanismo no está todavía aclarado, a la vista de estos resultados cabe suponer que la sobreexpresión de c-MYC en tumores rectales conduce a un aumento en la sensibilidad de la célula a la apoptosis inducida por las fluoropirimidinas. Dentro de la célula, el 5FU se transforma en varios metabolitos citotóxicos que se incorporan al ADN y ARN alterando la síntesis de ADN y conduciendo finalmente a la célula a la muerte celular programada. Dado que el 5FU es un fármaco específico de la fase S y por lo tanto sólo actúa en algunas fases celulares, los pacientes que presentaban tumores rectales con mayor proliferación y crecimiento en su perfil genético son los que mejor respondieron al tratamiento.

La sobre-expresión de estos genes (c-MYC, GNG4, POLA y RRM1) en muestras de tejido tumoral antes de iniciar la neoadyuvancia ha demostrado una buena correlación con la respuesta, especialmente para c-MYC. Aunque la sensibilidad es relativamente baja (60%), una sobre-expresión de c-MYC por encima de 64,45 tiene una alta especificidad (100%), lo que quiere decir que los pacientes que clasifica como respondedores (grados 1 y 2 de Mandard) lo son en realidad (en la muestra de esta Tesis Doctoral los 7 tumores con sobre-expresión de c-MYC por encima de 64,45 fueron posteriormente respondedores).

Cuando se evaluó la firma génica en su conjunto, es decir, los cuatro genes que se han podido validar (c-MYC, GNG4, POLA y RRM1), también se obtuvo una buena correlación con la respuesta. Los pacientes con sobre-expresión de tres de los cuatro genes por encima de los valores indicados en la Tabla 15 serán respondedores con una alta especificidad (100%) y valor predictivo positivo (100%). La sensibilidad sigue siendo relativamente baja (60%), con un valor predictivo negativo de 80% y una exactitud del 85%.

La supervivencia libre de enfermedad de los pacientes incluidos en el estudio, a los tres años, fue de 69,2% y la supervivencia global del 83,6%, datos comparables a los de otras series⁷¹. No se han podido demostrar diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes respondedores y no respondedores, posiblemente debido a que es una muestra pequeña para un estudio de este tipo y que el seguimiento es corto.

1. Predicción de respuesta utilizando microarrays de expresión en biopsias de tejido

El análisis de la literatura revela distintas publicaciones con un diseño similar al de esta Tesis Doctoral y que tratan de aclarar el mismo objetivo.

El primer estudio sobre la aplicación de una firma génica como predictor de respuesta al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto data de 2005¹⁶⁷, incluyó 30 pacientes procedentes de la base de datos del prestigioso Grupo Alemán para el Estudio del Cáncer de Recto¹⁶⁸ a los que se les administró radioquimioterapia preoperatoria con un esquema muy similar al de la serie de esta Tesis Doctoral (50.4 Gy de radiación, aplicada en 28 fracciones asociado a infusión continua de 5FU) y se intervinieron 6 semanas tras la finalización de la neoadyuvancia. La respuesta al tratamiento se valoró usando: la disminución del T (con respecto a la preoperatoria determinada por ecografía, uT) y los grados de remisión tumoral de Dworak (considerando respondedores los grados 3-4)¹⁰⁵. Basándose en el *downsizing* o disminución del T identificaron 54 genes expresados de forma diferente en muestras de tejido tumoral extraídas antes de la neoadyuvancia entre los pacientes respondedores versus no respondedores. Con estos genes consiguieron una precisión en la predicción de grupo de un 83%, tanto para respondedores como no respondedores, demostrando que el estudio de expresión génica mediante *microarrays* era útil para predecir la disminución del tamaño tumoral (medido por la disminución del ypT respecto al uT) como respuesta al tratamiento preoperatorio con radioquimioterapia. Estos 54 genes están implicados en diversas funciones biológicas como: la reparación del daño celular al ADN (SMC1), la organización de microtúbulos (CLMN y CDC42BPA), y la señalización celular (FLNB).

Tabla 18. Características y principales resultados de los estudios publicados en los cuales se determinó el perfil de expresión genética mediante microarrays de ADN en pacientes con adenocarcinoma de recto localmente avanzado sometidos a QRT preoperatoria. Downsizing: disminución del ypT con respecto al cT antes de iniciar la neoadyuvancia, VPN: valor predictivo negativo, VPP: valor predictivo positivo, 5FU: 5 fluoracilo, LV: leucovorín.

Estudio	Tipo muestra	Nº pacientes	Grupo validación	Dosis radioterapia	Valoración respuesta	Genes identificados: genes destacados	Variable resultado
				Quimioterapia			
Ghadimi 2005	Biopsia tejido tumoral	30	No	50,4 Gy/ 28 fracciones 5FU	Downsizing	54 genes: SMC1, CLMN, CDC42BPA y FLNB	Predicción grupo 83%
Watanabe 2006	Biopsia tejido tumoral	52	17	50,4 Gy -	Escala semi-cuantitativa japonesa	33 genes: • Sobreexpresados: LUM, THBS2 y LGALS1 • Reprimidos: CYP40 y GPX2	Predicción clase 82,4% Sensibilidad 50% Especificidad 100% VPP 100% VPN 76,6%
Kim 2007	Biopsia tejido tumoral	31	15	50,4Gy/28 fracciones 5FU+LV/ Capecitabina/ capecitabina+ irinotecan	Grados de remisión de Dworak	95 genes: TYMS y RAD23B	Precisión 87% Sensibilidad 100% Especificidad 82%
Rimkus 2008	Biopsia tejido tumoral	43	No	45Gy 5FU	Grados de remisión de Becker	42 genes: • Sobreexpresados: CASP1, SLC35E1, CCNK, STAT2 y ETS2 • Reprimidos: TDE1, USP42, M-RIP y FREM1	Precisión 81% Sensibilidad 71% Especificidad 86% VPP 71% VPN 86%
Nishioka 2011	Biopsia tejido tumoral	17	3	40Gy /20 fracciones S-1	Escala de la Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum	17 genes: MMP7, MMP14, MMP9, MMP1, MMP16 y RRM1	
Palma 2013	Sangre periférica	27	8	50,4Gy/ 28 fracciones Capecitabina/capecitabina+ oxaliplatino	Grados remisión de Mandard	8 genes: FALZ	
Tesis Doctoral	Biopsia tejido tumoral	26	8	50,4Gy/ 28 fracciones Capecitabina/capecitabina+ oxaliplatino	Grados remisión de Mandard	257 genes: c-MYC, POLA, RRM1 y GNG4	Exactitud 85% Sensibilidad 60% Especificidad 100% VPP 100% VPN 80%

Al año siguiente, el grupo japonés de Watanabe y cols. publicaron un análisis de microarrays de ADN con un objetivo similar: establecer un modelo de predicción de respuesta a la radioterapia preoperatoria¹⁶⁹. Analizaron un total de 52 pacientes, de ellos 35 en el grupo de ensayo y 17 en el grupo de validación. Las muestras se extrajeron mediante biopsia por colonoscopia antes de iniciar el tratamiento, que consistió en radioterapia preoperatoria (50.4 Gy) sin quimioterapia alguna, seguida de un período de 4 semanas de latencia y posteriormente resección quirúrgica. La evaluación de la respuesta se determinó mediante análisis anatomopatológico en la pieza quirúrgica, usando para ello la escala semicuantitativa japonesa. Se clasificaron como respondedores los grados 2-3 y no respondedores los grados 0-1. Con los 35 pacientes del ensayo se determinó un grupo de 33 genes diferencialmente expresados entre respondedores y no respondedores: 20 se sobreexpresaban, por ejemplo genes relacionados con apoptosis como lumican (LUM), thrombospondin 2 (THBS2) y galectin-1 (LGALS1), mientras que 13 se reprimían en el grupo de respondedores como cyclophilin 40 (CYP40) y glutathione peroxidase 2 (GPX2). A continuación, se realizó una predicción de clase con los 33 genes en los 17 pacientes del grupo de validación, encontrándose una exactitud de un 82,4% para la determinación de la clase, una sensibilidad de un 50%, una especificidad de un 100%, un valor predictivo positivo de un 100% y un valor predictivo negativo de un 76,6%. Los autores concluyeron que la utilización de una firma génica podría ser útil para predecir la respuesta a la radioterapia en el cáncer de recto.

Kim y cols. realizaron un estudio en 2007 con 46 pacientes (31 en el grupo de ensayo inicial y 15 para la validación) a los que se les extrajeron muestras de tejido tumoral y posteriormente se les administró radioterapia preoperatoria mediante 50.4 Gy en 28 fracciones asociado a quimioterapia (5FU + leucovorin, capecitabina o capecitabina + irinotecan)¹⁴⁵. Los pacientes fueron intervenidos a las 6 semanas y se clasificó la respuesta tumoral mediante los grados de remisión tumoral de Dworak. Identificaron un grupo de 95 genes a los que se aplicó el método LOOCV (*leave-one-out-cross-validation*) para predicción de la respuesta y encontraron que este grupo de genes permitía una predicción de respuesta tumoral con una precisión de un 84%, una sensibilidad de un 64%, especificidad de un 95%, valor predictivo positivo de un 88% y valor predictivo negativo de un 83%. En el grupo de validación se consiguió una precisión de un 87%, sensibilidad de un 100% y especificidad de un 82%. Entre los 95 genes destacaron el gen de la timidilato sintetasa (TYMS, implicado en la síntesis del ADN), que estaba altamente expresado en los tumores respondedores, y RAD23B (implicado en la reparación de la escisión de nucleótidos), que estaba elevado en los no respondedores y que previamente se había demostrado asociado a pacientes resistentes al

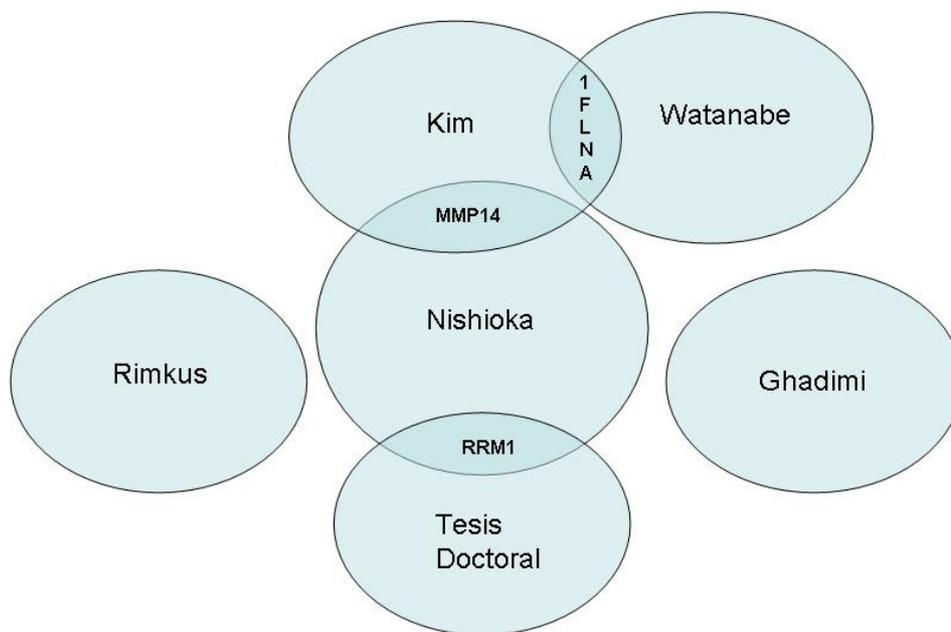
tratamiento con 5FU. Estos dos genes podrían usarse para evaluar la respuesta a tratamiento con 5FU.

Otro estudio similar es el llevado a cabo por el grupo de Rimkus y cols. en Alemania¹⁷⁰ con 43 pacientes en estadio uT3. Las biopsias del tejido tumoral fueron obtenidas mediante colonoscopia. El esquema terapéutico empleado fue radioquimioterapia de ciclo largo, 45 Gy en total, asociado a infusión continua de 5FU. Tras una latencia de 4-6 semanas, se practicó la resección quirúrgica habitual. La respuesta anatomopatológica se evaluó en la pieza quirúrgica, usando la clasificación de Becker (clasificando como respondedores el grado 1 y como no respondedores los grados 2-3). Aproximadamente un tercio de los pacientes fueron respondedores y dos tercios no respondedores. Se encontraron 42 genes que se expresaban de forma diferente y estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre respondedores y no respondedores. De ellos, 5 (FREM1, M-RIP, SDHC, TDE1 y USP42) tenían reducida su expresión en el grupo de los respondedores, mientras que el resto de genes estaban sobre-expresados y participaban en apoptosis (CASP1), transporte (SLC35E1), señalización celular (STAT2 y ETS2) y ciclo celular (CCNK). En el análisis de la exactitud a la hora de predecir la respuesta, se encontró que un 19% de los pacientes se clasificaban de forma incorrecta atendiendo a ese conjunto de genes. La sensibilidad fue de un 71%, la especificidad de un 86%, el valor predictivo positivo de un 71% y el valor predictivo negativo de un 86%. Un aspecto interesante fue que realizando el mismo análisis con muestras con distintos porcentajes de células tumorales (40%-60%-80%) no se obtuvo mejoría en cuanto a la capacidad de predicción en aquellas muestras con un porcentaje mayor de tejido tumoral.

Más recientemente, el grupo de Nishioka y cols. publicaron un estudio con el mismo objetivo que los anteriores. En este caso, se incluyeron 20 pacientes (17 en el grupo de ensayo y 3 en el grupo de validación), a los cuales se les extrajo una biopsia de tejido tumoral durante la colonoscopia¹⁴⁶. Los pacientes recibieron radioterapia (40 Gy en fracciones de 2 Gy), asociada a S-1, un quimioterápico oral de acción similar a la capecitabina también sensibilizador frente a la radioterapia que no está autorizado por el momento en Europa. Para evaluar la respuesta anatomopatológica se empleó la escala de la *Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum*, clasificando como no respondedores los grupos 0-1 y como respondedores los 2-3. Se empleó un *microarray* que contenía de 132 genes relacionados con la respuesta al 5FU y otros quimioterápicos. Se identificaron 17 genes expresados de forma diferente entre los dos subgrupos de pacientes (respondedores versus no respondedores). De ellos 5 eran metaloproteinasas (MMP1, MMP7, MMP9, MMP14 y MMP16). Además, se realizó un estudio inmunohistoquímico para evaluar la expresión de la proteína MMP7, cuyo gen era el que más se sobre-expresaba en tejido tumoral. De los pacientes respondedores, 4

presentaban sobre-expresión de MMP7 (4/10, 40%), mientras que ninguno de los no respondedores expresaban dicha proteína. Estos 17 genes se utilizaron para clasificar las muestras del grupo de validación, siendo correcta en los tres casos. Es de destacar que el caso que no era respondedor no sobre-expresó ninguno de los genes. Los autores proponen el gen MMP7 como posible biomarcador de respuesta en el cáncer de recto. El principal factor limitante de este estudio es el número tan pequeño de pacientes incluidos tanto en el grupo de ensayo como en el de validación.

Figura 34. Esquema de los perfiles de expresión genética predictivos de respuesta a la radioquimioterapia que se han publicado y sus puntos en común. Sólo tres genes aparecen sobre-expresados en más de un estudio (modificado de Akiyoshi¹⁷¹).



En la presente Tesis Doctoral se ha identificado un perfil con 257 genes que se sobre-expresan en pacientes respondedores. Cabe destacar que hay uno de la familia de las metaloproteinasas de matriz, como en la publicación de Nishioka y Kim (MMP12), aunque es diferente de los que identificaron estos investigadores. Sólo hay un gen que previamente se haya identificado como relacionado con la respuesta, que es el RRM1¹⁴⁶, como se representa en la Figura 34.

Como se puede comprobar existen grandes discrepancias en los resultados de estos estudios. Cada uno encuentra un perfil genético diferente y entre todos ellos sólo hay dos genes que aparecen en más de un estudio publicado (FLNA y MMP14)¹⁷¹. La falta de solapamiento de los resultados en los perfiles de expresión genética puede justificarse en un campo tan concreto como es la predicción de la respuesta a la radioquimioterapia en el cáncer de recto localmente avanzado por:

- Diferencias en el contenido tumoral.
- Diferentes esquemas de neoadyuvancia empleados: sólo radioterapia, radioterapia asociada a infusión continua de 5FU, asociada a tratamiento oral: capecitabina, S1, capecitabina + irinotecan.
- Diferentes plataformas de microarrays empleadas, así como distintas metodologías a la hora de amplificar el ADN. Así, Ghadimi utilizó la plataforma de microarrays de Ambion, Kim la U133A GeneChip de Affymetrix, mientras que Watanabe usó la U95Av2 GeneChip de Affymetrix, etc.
- Cada grupo utiliza una definición de respuesta al tratamiento diferente: los grados de regresión de Dworak, la escala semicuantitativa japonesa, la de Becker, etc.
- Herramientas analíticas diferentes (informáticas).
- Número de pacientes relativamente bajo en casi todos los estudios.
- Heterogeneidad genética de los tumores.

2. Predicción de respuesta utilizando *microarrays* de expresión en sangre periférica

Mas atrevido aun, parece la idea de buscar firmas de predicción de respuesta en la sangre periférica. Una publicación reciente, analiza el perfil genético de células de la serie blanca procedentes de sangre periférica y su relación con la respuesta a la radio-quimioterapia de tumores de recto en estadio localmente avanzado¹⁷². El esquema terapéutico concuerda con el de este estudio, al ser los autores miembros del mismo equipo de investigación. Se extrajeron muestras de sangre periférica de 27 pacientes antes de iniciar la neoadyuvancia. De éstas se aisló el material genético de la serie blanca y se utilizó para determinar el perfil de expresión genético mediante *microarrays* de ADN. Se identificaron 8 genes diferencialmente expresados ($p < 0,05$) entre pacientes respondedores y no respondedores (de acuerdo con los grados de remisión tumoral de Mandard, siendo respondedores los grados 1-2 y no respondedores los grados 3-4-5): BC035656.1, CAPG, CIR, FALZ, HLA-DPB2, NUPL2, PRDM2 y ZFP36. Se analizaron los niveles de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa encontrando

diferencias estadísticamente significativas sólo para FALZ. Ninguno de estos 8 genes se encuentra entre los 257 genes identificados en tejido tumoral en la presente Tesis Doctoral.

La literatura sugiere que las células mononucleares de la sangre periférica pueden ser marcadores diagnósticos y pronósticos en tumores de distinta localización (renales, de mama, pancreáticos y colorrectales)^{109, 173-176}. Además, se ha propuesto, que la reducción del tamaño tumoral no depende sólo del daño directo que la radioterapia ejerce sobre las células, sino que podría verse influida en gran manera por la respuesta inmune del paciente¹⁷⁷. Las células tumorales irreversiblemente dañadas por la radioterapia expresan antígenos que pueden inducir la respuesta inmune antitumoral. Mas aún, el porcentaje de linfocitos presenta una fuerte asociación con la respuesta a la QRT, por lo que se sugiere que la inmunidad mediada por linfocitos puede ser un factor determinante para conseguir respuesta¹⁷⁸.

3. Predicción de respuesta utilizando microarrays de expresión en líneas celulares

Ojima y cols. realizaron un estudio de expresión con *microarrays* en líneas celulares humanas de cáncer colorrectal para determinar el perfil genético relacionado con la capacidad de resistencia a la radioterapia¹⁷⁹. Para ello, utilizaron 5 líneas celulares, que fueron irradiadas repetidas veces hasta conseguir radio-resistencia. Por otro lado, extrajeron muestras de tejido tumoral de 30 pacientes, pre-terapéuticas, que se emplearon para confirmar mediante RT-PCR la expresión de algunos de los genes identificados en el estudio con *microarrays*. A diferencia de los estudios presentados hasta ahora los pacientes recibieron neoadyuvancia mediante radioterapia de ciclo corto, un total de 20 Gy en 4 fracciones en una semana, asociado a quimioterapia (5FU intravenoso y tegafur oral durante 1 semana). La evaluación de la respuesta se realizó a nivel de la pieza quirúrgica según los grados de remisión descritos por Kusunoki y cols., siendo el grado 4 la respuesta completa¹⁸⁰. Los pacientes se dividieron en dos subgrupos: respuesta mayor (grados 3-4) y respuesta menor (1-2). El análisis de los resultados identificó 17 genes sobreexpresados y 142 reprimidos en las líneas celulares radio-resistentes. Entre todos ellos, se eligieron dos (EIF5a2 y PTMA) para la validación mediante RT-PCR en muestras de biopsias. La expresión de EIF5a2, que regula la apoptosis dependiente de p53¹⁸¹, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes respondedores versus no respondedores. En cambio, *protomiosina α* (PTMA), implicada en proliferación celular y apoptosis, así como en la actividad mitocondrial¹⁸², confirmó su sobreexpresión en las muestras tumorales en el subgrupo con una respuesta menor. Los autores concluyeron que la expresión PTMA podría utilizarse como marcador de la eficacia de la radioterapia en el ámbito clínico.

Eschrich y cols. desarrollaron un modelo predictivo de sensibilidad a radioterapia, analizando la expresión genética mediante *microarrays* de Affymetrix y otras variables biológicas que determinan respuesta a la radioterapia (tejido de origen, mutaciones en P53 y K-RAS) en 48 líneas celulares de cáncer humano. Identificaron 10 genes con los que se desarrolló un algoritmo predictivo de radiosensibilidad intrínseca¹⁸³. Este algoritmo se aplicó a 14 muestras procedente de neoplasias de recto tratadas con QRT, permitiendo separar respondedores de no respondedores con una sensibilidad de un 80%, una especificidad de un 82% y un valor predictivo positivo de un 82%.

Entre los genes identificados destaca SUMO1, conocido por su participación en el transporte nuclear, regulación de la transcripción, apoptosis y estabilidad proteica¹⁸⁴. En ésta Tesis Doctoral se encuentra un gen relacionado con éste, el UBA2 (*SUMO-1 activating enzyme subunit*), cuya proteína forma un heterodímero que activa SUMO¹⁸⁵.

El equipo de Spitzner analizó la expresión genética mediante *microarrays* (Agilent) de 12 líneas celulares humanas de origen colorrectal antes y después de someterlas a 5FU y radioterapia (2 Gy)¹⁸⁶. Se identificaron 4.796 características que se correlacionaban con la sensibilidad a este tratamiento. Destacaron la importancia de las vías de la insulina y señalización Wnt para la respuesta al tratamiento y postularon como posibles dianas terapéuticas STAT3, RASSF1, DOK3 y ERBB2.

La utilización de líneas celulares para identificar genes responsables de la radio o quimio-radio sensibilidad puede ser de interés al separar éste efecto de otros posibles dependientes del paciente. Sin embargo, esta sensibilidad a la radioterapia es sólo uno de los factores que pueden determinar si un tumor es o no “curable” mediante radio-quimioterapia¹⁷¹. Existen otros factores a tener en cuenta, como otras vías de señalización que podrían influir en la respuesta. Por este motivo, un perfil genético extrapolado del obtenido mediante líneas celulares puede no ajustarse a la realidad. Harían falta más estudios que pudiesen corroborar estos hechos.

4. Predicción de respuesta utilizando *microarrays* de micro-ARN

Existe un nuevo campo en el mundo de la genética y de la regulación de la expresión genética, descubierto en 1993, que ha experimentado un gran desarrollo en la última década, los micro-ARNs (mi-ARN). Un mi-ARN es una pequeña secuencia de ARN monocatenario (normalmente entre 18 y 25 nucleótidos) que no codifican proteínas, pero que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión genética. Los mi-ARN son moléculas de ARN transcritas a partir de genes de ADN, pero que no son traducidas a proteínas. Actúan

uniéndose a hebras complementarias de ARN mensajero, normalmente inhibiendo la traducción y silenciando el gen. Su función puede ser tanto la de simular oncogenes como la de genes supresores de tumores¹⁸⁷. La expresión aberrante de los mi-ARN se ha asociado a varias patologías. Se han relacionado algunas alteraciones en su regulación con el cáncer colorrectal^{188, 189}. Incluso se ha encontrado que la RQT en el cáncer de recto localmente avanzado induce cambios de expresión en los mi-ARN en muestras de tejido tumoral y estos se asocian con una buena respuesta al tratamiento¹⁹⁰.

Della Vittoria Scarpati y cols. publicaron en 2012 un estudio mediante *microarrays* de mi-ARN en el que establecieron un perfil específico asociado a respuesta al tratamiento en biopsias de pacientes con neoplasias de recto localmente avanzado que se sometían a neoadyuvancia¹⁹¹. Extrajeron biopsias de 35 pacientes afectos de cáncer de recto T3-4/N+ antes de iniciar radioterapia (45 Gy) asociada a capecitabina y oxaliplatino. Tras un descanso de 6-8 semanas se realizó la resección quirúrgica convencional. La respuesta anatomopatológica fue clasificada según los grados de regresión tumoral de Mandard: pacientes respondedores (TRG 1) de los no respondedores (TRG 2, 3, 4 y 5). Finalmente, los resultados fueron validados mediante RT-PCR cuantitativa.

Se estudiaron 373 mi-ARN, de los cuales 53 estaban sobre-expresados en el grupo de respondedores, frente a 4 que se sobre-expresaban en los no respondedores. De ellos seleccionaron 14 para la validación mediante RT-PCR cuantitativa confirmándose 13 de ellos. Destacan dos mi-ARN (miR-622 y miR-630) que participan en mecanismos de reparación del ADN, posiblemente inhibiéndola y convergiendo con la vía de la P53. Estos 2 mi-ARN no se expresaban en las muestras procedentes de pacientes respondedores, con una sensibilidad y especificidad de un 100%.

Recientemente se ha publicado otro estudio¹⁹² en el que los autores extrajeron 12 muestras de ARN de biopsias pre-terapéuticas fijadas en parafina y compararon su perfil de expresión de mi-ARN con la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Se identificaron 3 mi-RNA (miR-16, miR-153 y miR-590-5p) asociados a respuesta completa y dos (miR-519c-3p y miR-561) que predecían buena versus mala respuesta, con una exactitud que se aproximaba a un 100%.

A la vista de los resultados de estos dos últimos estudios, en las que se alcanza una alta capacidad de predicción de respuesta, incluso con material genético extraído de muestras de tejido tumoral fijado en parafina, parece que el futuro camina por la identificación de perfiles de mi-ARN. Sin embargo, es un campo todavía muy novedoso y que no cuenta con la suficiente evidencia científica por el momento.

5. Predicción de respuesta utilizando SAGE (*serial analysis of gene expression*)

Casado y cols. en 2011 realizaron un análisis en serie de expresión génica para identificar un perfil genético que pudiese predecir la respuesta a la radioquimioterapia en el cáncer de recto localmente avanzado¹⁹³. Se hizo una selección inicial de genes (mediante análisis SAGE), para la cual reclutaron 25 pacientes a los cuales les aplicaron un esquema de neoadyuvancia compuesto por oxaliplatino y raltitrexed (130 mg/m² y 3 mg/m², los días 1, 21 y 42) en tres ciclos, junto con radioterapia (50,4Gy en 28 fracciones). La respuesta se determinó en la pieza quirúrgica siguiendo la clasificación de Dworak y cols.¹⁰⁵. A diferencia de los estudios presentados hasta ahora, el objetivo era encontrar genes predictivos de mala respuesta. Identificaron 24 genes asociados a falta de respuesta. Basándose en estos resultados y en la literatura, seleccionaron 53 genes para un estudio posterior retrospectivo en 94 pacientes de cáncer de recto localmente avanzado que habían recibido neoadyuvancia (con cuatro esquemas diferentes de quimio-radioterapia). Se tomaron muestras almacenadas, fijadas en parafina de éstos tumores y se les realizó qRT-PCR siguiendo el protocolo *TaqMan Low Density Array* (TLDA). De esta manera identificaron un perfil genético compuesto por 13 genes que permitían una predicción de no respuesta con una exactitud del 86%, sensibilidad del 87% y una especificidad del 82%. El principal punto flojo de éste estudio es la variedad de pautas de neoadyuvancia empleadas. La tecnología empleada para la determinación del perfil genético trata de ser más aplicable a la práctica clínica que los estudios mediante *microarrays* de expresión, al emplear muestras de tumor fijadas en parafina. Actualmente están realizando un estudio multicéntrico avalado por la GEMCAD (Grupo Español Multidisciplinar en Cáncer Digestivo) para confirmar estos resultados.

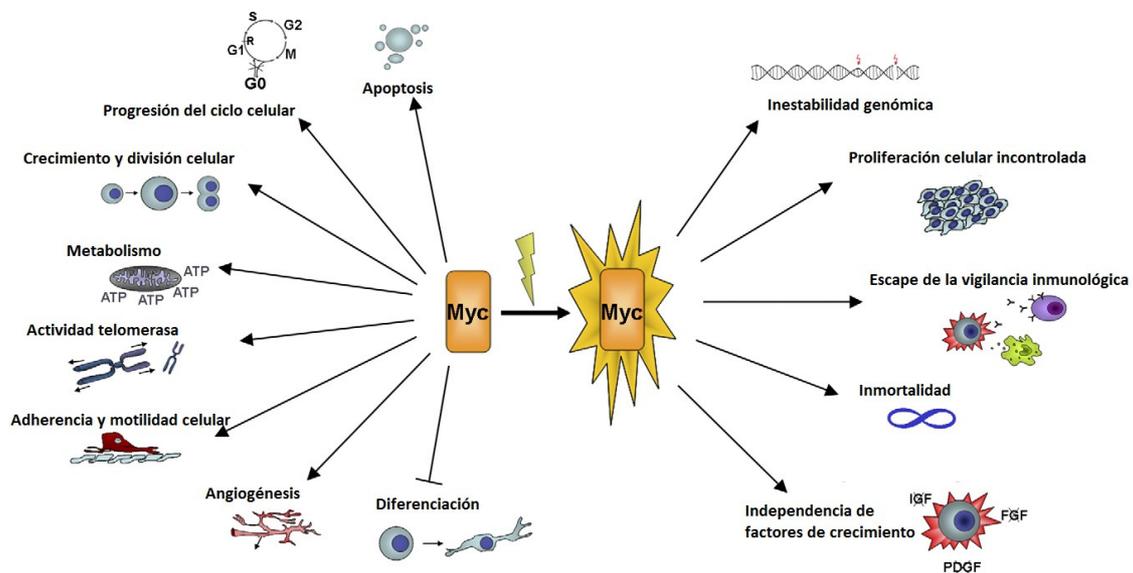
6. c-MYC

Las proteínas MYC pertenecen a una red de reguladores transcripcionales cuya actividad está estrechamente regulada en las células normales, que sólo muestran sobreexpresión cuando se van a dividir, en el paso entre la fase G1 y S¹⁹⁴. c-MYC actúa formando un complejo con MAX que se une al ADN activando la transcripción, o bien interactúa con otras proteínas que están implicadas en la transcripción. Tanto el ARNm como la proteína tienen una vida media muy corta y, por tanto son factores limitantes de la expresión.

c-MYC regula la expresión de una gran variedad de genes implicados, entre otros procesos, en proliferación celular, apoptosis, metabolismo, angiogénesis e invasión¹⁹⁵ como se ve en la Figura 35. Si existe una expresión anormal de c-MYC, éste estimula la vía de P53 y

P19/P14ARF conduciendo a la célula a apoptosis o muerte celular programada. Con éste mecanismo se trata de proteger a las células normales en crecimiento de los cambios neoplásicos.

Figura 35. Procesos celulares controlados por c-MYC en condiciones normales (a la izquierda) y en los tumores (a la derecha). c-MYC es un regulador clave de múltiples actividades biológicas, como son el crecimiento y división celular (regulación de la modificación de la cromatina y componentes de la biosíntesis), progresión del ciclo celular (modulación de ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas y fosfatasa), apoptosis (mecanismos dependientes de la p53 o independientes de la misma), diferenciación celular (inhiben genes que estancan el crecimiento), metabolismo celular (glucólisis, transporte y biosíntesis de amino-ácidos, síntesis de macromoléculas y metabolismo del ADN), angiogénesis (aumento VEGF), adhesión celular y motilidad (control de la expresión de integrinas). Las alteraciones en la regulación de Myc conducen a la apoptosis, inestabilidad genómica, proliferación celular incontrolada, escape de la vigilancia del sistema inmune, independencia de los factores de crecimiento e inmortalidad de las células¹⁹⁶.



La expresión del proto-oncogen c-MYC está alterada en una gran variedad de neoplasias humanas, tanto en su estructura como en su función (linfoma Burkitt, leucemia, cáncer de pulmón, adenocarcinoma de colon y recto)¹⁹⁷ a la vez que su amplificación está relacionada con un peor pronóstico¹⁹⁸. El 70% de los cánceres de colon sobre expresan c-MYC. En células con alteraciones en los mecanismos de la apoptosis, la alteración de la regulación de c-MYC promueve la tumorigénesis¹⁹⁶.

Estudios *in vitro* han demostrado que el aumento en la expresión de c-MYC conduce a un mayor aumento en la expresión de la misma, sensibilizando a la célula ante estímulos apoptóticos¹⁹⁹. En pacientes con cáncer de colon en estadio II-III tratados con 5FU se ha

demostrado una mejor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en aquellos cuyos tumores tenían amplificación de c-MYC²⁰⁰. Posteriormente, se comprobó que la sensibilidad de los tumores de colon al 5FU no sólo depende de la sobre-expresión de c-MYC, sino también de la presencia de P53 no mutado²⁰¹. La presencia de P53 no mutado se ha relacionado con la transactivación de c-MYC y, por lo tanto, con mayor aumento de sus niveles y mejor sensibilidad a la quimioterapia basada en 5FU.

Es interesante recalcar el efecto dual de c-MYC puesto que, su activación provoca la entrada en la fase G1 del ciclo celular, induciendo la proliferación, y además tiene actividad pro-apoptótica. Una de las explicaciones a esta doble función es que c-MYC pone en marcha toda la maquinaria proteica de proliferación la cual está íntimamente ligada a la maquinaria apoptótica, sensibilizando a la célula ante estímulos apoptóticos. La inactivación de c-MYC puede provocar regresión tumoral y es por eso que está actualmente es estudio como posible diana de tratamientos farmacológicos²⁰².

Por el contrario, en pacientes con cáncer de recto, c-MYC se ha asociado con una supervivencia menor²⁰³. Todavía no hay suficiente evidencia científica a nivel del cáncer de recto para poder establecer una clara relación entre la sobre-expresión de c-MYC y la respuesta de estos tumores en concreto a la quimioterapia.

6. Limitaciones de la presente Tesis Doctoral

Si bien la tecnología de microarrays está siendo cada vez más empleada al permitir el estudio de una manera relativamente sencilla de miles de genes en un solo experimento, además de no requerir secuenciación, su uso no está exento de limitaciones.

Sólo un 5% de los genes están activos en una célula en un momento determinado¹⁸⁴. Es un reto conseguir determinar qué material genético es expresado en un tipo celular bajo unas condiciones dadas, para llegar a una mejor comprensión de su biología molecular.

El transcriptoma representa todo el ARNm transcrito bajo unas circunstancias, de forma global en una célula¹⁸⁴. El fenotipo del cáncer sólo está determinado parcialmente por su transcriptoma, pero éste nos da una imagen del estado fisiológico de sus células en un momento determinado. Para determinar este transcriptoma han surgido distintas metodologías, entre ellas los microarrays, que no requieren secuenciación y permiten un rápido análisis de múltiples genes y múltiples muestras.

Esta tecnología presenta también limitaciones como las derivadas del coste, que la hace poco accesible²⁰⁴.

La cantidad de tejido tumoral obtenida y la complejidad de la muestra extraída en si pueden suponer una limitación en cuanto a la calidad y cantidad de ARN aislado. Un aspecto imprescindible es el rápido procesamiento de la muestra para evitar la degradación de ARN que podría conducir a resultados erróneos. Para evitarlo, en este estudio las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido tan pronto se extrajeron.

Cada uno de los pasos del procesamiento puede asociarse a errores por lo que los experimentos se deben hacer también por duplicado. Además, los tejidos están compuestos de diferentes tipos celulares y la expresión genética depende de todos ellos. Según el tejido predominante en la muestra, podrá variar dicha expresión, conduciendo a nuevos errores. Técnicas de microdissección con láser pueden ayudar a evitar estos errores, al seleccionar mejor los tipos celulares, sin embargo, dado que en la expresión de un tumor influyen todos sus tipos celulares, en la actualidad parece más útil la extracción del ADN de toda la muestra. En el estudio de Rimkus¹⁷⁰ no se consigue mejorar la sensibilidad y especificidad al aumentar el porcentaje de células tumorales de las muestras.

Otra de las limitaciones viene dada por la cantidad de tejido que hace falta para la extracción del material genético. Tres de las muestras extraídas para este estudio no fueron adecuadas para extraer suficiente material genético.

Existen, además, algunos factores en el presente estudio que podrían ser una limitación a la hora de interpretar los resultados. En primer lugar está el bajo número de pacientes incluidos. A pesar de ello, tras el cálculo inicial del tamaño muestral se encontró que la potencia del estudio era mayor de 0.8 y por lo tanto suficiente para poder extraer conclusiones en base a los resultados.

En segundo lugar está el hecho de que no todos los pacientes han recibido el mismo tratamiento neoadyuvante. El 58% de los pacientes recibieron capecitabina, mientras que el resto recibieron capecitabina y oxaliplatino asociado a la radioterapia. Para descartar un posible sesgo por este tratamiento se estratificaron los dos grupos (respondedores y no respondedores) según el fármaco empleado y se comprobó que no existían diferencias estadísticamente significativas y que, por lo tanto, los grupos eran homogéneos para los tratamientos y la quimioterapia empleada no era un factor de confusión. Lo que concuerda con el hecho de que la base del tratamiento neoadyuvante es la radioterapia, produciendo la quimioterapia solo un efecto sensibilizador celular marginal.

Otra posible fuente de error es la valoración de la respuesta anatomopatológica. Se ha empleado la clasificación de regresión tumoral de Mandard, puesto que es la que se empleaba previamente en los Servicios de Cirugía General y Anatomía Patológica del Hospital Virgen de las Nieves, en el cual se ha realizado el estudio, todo ello amparado por la Asociación Española

de Cirujanos en su proyecto nacional auditado cancer de recto. Se han agrupado como respondedores los grados de remisión 1 y 2 (remisión completa y escasos nidos celulares entre intensa fibrosis). Haciendo cortes más finos y una exploración más detallada de un tumor se podría encontrar que un paciente cuya respuesta haya sido clasificada como completa que tuviese en realidad escasos nidos celulares entre intensa fibrosis y por lo tanto sería un TRG2. A su vez, en los tumores tratados mediante radio y quimioterapia con un TRG2, no existe seguridad de que esas células sean viables. Podrían ser células irreversiblemente dañadas, que hayan entrado en proceso de apoptosis y que de dejar una latencia algo mayor (por ejemplo 10 semanas) hasta la intervención desarrollarían una respuesta completa. Esta incertidumbre se puede minimizar con un estudio cuidadoso por el patólogo, como el que se ha realizado para la presente tesis doctoral, pero no se puede eliminar completamente. Por este motivo se han considerado como respondedores los dos grupos.

Por último y dentro de este mismo contexto, una posible fuente de error corregida es el hecho de haber eliminado 6 pacientes por discordancias entre el grado de remisión tumoral y la disminución del estadio. Esta discordancia hacía difícil la clasificación de los mismos ya que mostraban algunos datos de respondedor y otros de no respondedor. Su eliminación hizo más homogéneo el grupo y permitió extraer conclusiones, sin embargo, estos pacientes pertenecen al espectro variable que se encuentra en la práctica clínica diaria y por lo tanto su eliminación puede inducir un sesgo.

CONCLUSIONES

Mediante estudio con *microarrays* de genoma completo se ha identificado un perfil genético compuesto por 257 genes cuya expresión se asocia a una buena respuesta a la radioquimioterapia en el cáncer de recto localmente avanzado.

1. Se ha comprobado que la mayoría de los genes sobre-expresados en pacientes respondedores están relacionados con el metabolismo de las pirimidinas, señalización celular y, en concreto con c-MYC.
2. El mecanismo de sobre-expresión de c-MYC no es la amplificación.
3. A nivel proteico, no existen diferencias en la sobre-expresión de c-MYC entre muestras de pacientes respondedores y no respondedores y por lo tanto la tinción con inmunohistoquímica de c-MYC no es adecuada para seleccionar los pacientes.
4. El uso de c-MYC como marcador de respuesta al tratamiento neoadyuvante presentó una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100% para predecir buena respuesta, con un área bajo la curva de 0,862. Es el gen que muestra mejor capacidad predictiva de los cuatro que se han validado mediante qRT-PCR.
5. La firma génica compuesta por c-MYC, GNG4, POLA y RRM1 tiene una sensibilidad del 60%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100%, valor predictivo negativo del 80% y exactitud del 85% para la predicción de respuesta a la radioquimioterapia en cáncer de recto localmente avanzado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011; 61: 69-90.
2. Marmot M, Atinmo T, Byers T, et al. *Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington DC: AICR, 2007.
3. Giovannucci E and Michaud D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology*. 2007; 132: 2208-25.
4. Sung MK, Yeon JY, Park SY, Park JH and Choi MS. Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1229: 61-8.
5. Zandonai AP, Sonobe HM and Sawada NO. [The dietary risk factors for colorectal cancer related to meat consumption]. *Revista da Escola de Enfermagem da U S P*. 2012; 46: 234-9.
6. Bingham SA. High-meat diets and cancer risk. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1999; 58: 243-8.
7. Cross AJ and Sinha R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2004; 44: 44-55.
8. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999; 91: 916-32.
9. Geelen A, Schouten JM, Kamphuis C, et al. Fish consumption, n-3 fatty acids, and colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *American journal of epidemiology*. 2007; 166: 1116-25.
10. Pot GK, Majsak-Newman G, Geelen A, et al. Fish consumption and markers of colorectal cancer risk: a multicenter randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2009; 90: 354-61.
11. Aune D, Chan DS, Lau R, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Bmj*. 2011; 343: d6617.
12. Vargas AJ and Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 2012; 27: 613-23.
13. Planck M, Anderson H, Bladstrom A, Moller T, Wenngren E and Olsson H. Increased cancer risk in offspring of women with colorectal carcinoma: a Swedish register-based cohort study. *Cancer*. 2000; 89: 741-9.
14. Kennedy DA, Stern SJ, Moretti M, et al. Folate intake and the risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer epidemiology*. 2011; 35: 2-10.
15. Sanderson P, Stone E, Kim YI, et al. Folate and colo-rectal cancer risk. *The British journal of nutrition*. 2007; 98: 1299-304.
16. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011; 22: 1958-72.
17. Hansen RD, Albieri V, Tjonneland A, Overvad K, Andersen KK and Raaschou-Nielsen O. Effects of smoking and antioxidant micronutrients on risk of colorectal cancer. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013; 11: 406-15 e3.
18. Slattery ML, Curtin K, Anderson K, et al. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92: 1831-6.
19. Raimondi S, Botteri E, Iodice S, Lowenfels AB and Maisonneuve P. Gene-smoking interaction on colorectal adenoma and cancer risk: review and meta-analysis. *Mutation research*. 2009; 670: 6-14.
20. Cole BF, Logan RF, Halabi S, et al. Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009; 101: 256-66.

21. Din FV, Theodoratou E, Farrington SM, et al. Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer. *Gut*. 2010; 59: 1670-9.
22. Grodstein F, Newcomb PA and Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *The American journal of medicine*. 1999; 106: 574-82.
23. Marjoribanks J, Farquhar C, Roberts H and Lethaby A. Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012; 7: CD004143.
24. Rymer J, Wilson R and Ballard K. Making decisions about hormone replacement therapy. *Bmj*. 2003; 326: 322-6.
25. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002; 288: 321-33.
26. Matkowskyj KA, Chen ZE, Rao MS and Yang GY. Dysplastic lesions in inflammatory bowel disease: molecular pathogenesis to morphology. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2013; 137: 338-50.
27. Chen YK, Yeh JH, Lin CL, et al. Cancer risk in patients with cholelithiasis and after cholecystectomy: a nationwide cohort study. *Journal of gastroenterology*. 2013.
28. Hartz A, He T and Ross JJ. Risk factors for colon cancer in 150,912 postmenopausal women. *Cancer causes & control : CCC*. 2012; 23: 1599-605.
29. Lin OS. Acquired risk factors for colorectal cancer. *Methods in molecular biology*. 2009; 472: 361-72.
30. Schmidt M, Smastuen MC and Sondena K. Increased cancer incidence in some gallstone diseases, and equivocal effect of cholecystectomy: a long-term analysis of cancer and mortality. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2012; 47: 1467-74.
31. Laghi L and Malesci A. Microsatellite instability and therapeutic consequences in colorectal cancer. *Digestive diseases*. 2012; 30: 304-9.
32. Pino MS and Chung DC. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2011; 5: 385-99.
33. Zhang X and Li J. Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2013; 5: 12-9.
34. Chan TL, Zhao W, Leung SY, Yuen ST and Cancer Genome P. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer research*. 2003; 63: 4878-81.
35. Hawkins NJ, Bariol C and Ward RL. The serrated neoplasia pathway. *Pathology*. 2002; 34: 548-55.
36. Jass JR, Whitehall VL, Young J and Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology*. 2002; 123: 862-76.
37. Patel SG and Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Current gastroenterology reports*. 2012; 14: 428-38.
38. Church J. Familial adenomatous polyposis. *Surgical oncology clinics of North America*. 2009; 18: 585-98.
39. Arends MJ. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2013; 21: 97-102.
40. Heald B, Mester J, Rybicki L, Orloff MS, Burke CA and Eng C. Frequent gastrointestinal polyps and colorectal adenocarcinomas in a prospective series of PTEN mutation carriers. *Gastroenterology*. 2010; 139: 1927-33.
41. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS and Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012; 18: 400-7.

42. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM and Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Diseases of the colon and rectum*. 1991; 34: 424-5.
43. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP and Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999; 116: 1453-6.
44. Laghi L, Bianchi P, Roncalli M and Malesci A. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004; 96: 1402-3; author reply 3-4.
45. Burt RW. Colon cancer screening. *Gastroenterology*. 2000; 119: 837-53.
46. Majumdar SR, Fletcher RH and Evans AT. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *The American journal of gastroenterology*. 1999; 94: 3039-45.
47. Compton CC. Pathologic prognostic factors in the recurrence of rectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2002; 2: 149-60.
48. Nicholls RJ, Mason AY, Morson BC, Dixon AK and Fry IK. The clinical staging of rectal cancer. *The British journal of surgery*. 1982; 69: 404-9.
49. Decanini-Teran CO, Gonzalez-Acosta J, Obregon-Mendez J and Vega-de Jesus M. [Rectal cancer: diagnosis, screening and treatment]. *Cirugia y cirujanos*. 2011; 79: 481-7.
50. Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, et al. Diagnostic accuracy of MRI for assessment of T category, lymph node metastases, and circumferential resection margin involvement in patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Annals of surgical oncology*. 2012; 19: 2212-23.
51. Taylor FG, Swift RI, Blomqvist L and Brown G. A systematic approach to the interpretation of preoperative staging MRI for rectal cancer. *AJR American journal of roentgenology*. 2008; 191: 1827-35.
52. Ramos E, Valls C, Martinez L, et al. Preoperative staging of patients with liver metastases of colorectal carcinoma. Does PET/CT really add something to multidetector CT? *Annals of surgical oncology*. 2011; 18: 2654-61.
53. Llamas-Elvira JM, Rodriguez-Fernandez A, Gutierrez-Sainz J, et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET in the preoperative staging of colorectal cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2007; 34: 859-67.
54. Delbeke D. Oncological applications of FDG PET imaging: brain tumors, colorectal cancer, lymphoma and melanoma. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1999; 40: 591-603.
55. Yasuda S, Fujii H, Nakahara T, et al. 18F-FDG PET detection of colonic adenomas. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2001; 42: 989-92.
56. Cohade C, Osman M, Leal J and Wahl RL. Direct comparison of (18)F-FDG PET and PET/CT in patients with colorectal carcinoma. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2003; 44: 1797-803.
57. Edge SBB, D.R.; Compton, C.C.; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. (Eds.). *Colon and Rectum. AJCC Cancer Staging Manual*. 7 ed. New York: Springer, 2010.
58. Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE and Wruble LD. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology*. 1985; 89: 328-36.
59. Bhangu A, Brown G, Nicholls RJ, Wong J, Darzi A and Tekkis P. Survival Outcome of Local Excision versus Radical Resection of Colon or Rectal Carcinoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Population-Based Study. *Annals of surgery*. 2013; 258: 563-71.
60. Palma P, Freudenberg S, Samel S and Post S. Transanal endoscopic microsurgery: indications and results after 100 cases. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2004; 6: 350-5.

61. Palma P, Horisberger K, Joos A, Rothenhoefer S, Willeke F and Post S. Local excision of early rectal cancer: is transanal endoscopic microsurgery an alternative to radical surgery? *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*. 2009; 101: 172-8.
62. Borschitz T, Heintz A and Junginger T. The influence of histopathologic criteria on the long-term prognosis of locally excised pT1 rectal carcinomas: results of local excision (transanal endoscopic microsurgery) and immediate reoperation. *Diseases of the colon and rectum*. 2006; 49: 1492-506; discussion 500-5.
63. Yu CS, Yun HR, Shin EJ, et al. Local excision after neoadjuvant chemoradiation therapy in advanced rectal cancer: a national multicenter analysis. *American journal of surgery*. 2013; 206: 482-7.
64. Mellgren A, Sirivongs P, Rothenberger DA, Madoff RD and Garcia-Aguilar J. Is local excision adequate therapy for early rectal cancer? *Diseases of the colon and rectum*. 2000; 43: 1064-71; discussion 71-4.
65. Bujko K, Rutkowski A, Chang GJ, Michalski W, Chmielik E and Kusnierz J. Is the 1-cm rule of distal bowel resection margin in rectal cancer based on clinical evidence? A systematic review. *Annals of surgical oncology*. 2012; 19: 801-8.
66. Heald RJ and Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*. 1986; 1: 1479-82.
67. Enker WE, Thaler HT, Cranor ML and Polyak T. Total mesorectal excision in the operative treatment of carcinoma of the rectum. *Journal of the American College of Surgeons*. 1995; 181: 335-46.
68. Havenga K, Enker WE, McDermott K, Cohen AM, Minsky BD and Guillem J. Male and female sexual and urinary function after total mesorectal excision with autonomic nerve preservation for carcinoma of the rectum. *Journal of the American College of Surgeons*. 1996; 182: 495-502.
69. de Haas-Kock DF, Baeten CG, Jager JJ, et al. Prognostic significance of radial margins of clearance in rectal cancer. *The British journal of surgery*. 1996; 83: 781-5.
70. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2001; 345: 638-46.
71. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004; 351: 1731-40.
72. Chaoul H. Die Behandlung operative freigelegter Rektumkarzinome mit der Röntgenstrahlung. *Munich Med Wochenschr*. 1936; 83.
73. Lamarrque PL and Gross CG. La radiotherapie de contact des cancer du rectum. *J Radiol Electrol*. 1946; 27: 333-48.
74. Papillon J. Present status of radiation therapy in the conservative management of rectal cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 1990; 17: 275-83.
75. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1991; 324: 709-15.
76. Trakarnsanga A, Gonen M, Shia J, et al. What is the significance of the circumferential margin in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy? *Annals of surgical oncology*. 2013; 20: 1179-84.
77. Crehange G, Bosset JF and Maingon P. [Preoperative radiochemotherapy for rectal cancer: forecasting the next steps through ongoing and forthcoming studies]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2011; 15: 440-4.
78. Yu SK, Tait D, Chau I and Brown G. MRI predictive factors for tumor response in rectal cancer following neoadjuvant chemoradiation therapy - implications for induction

- chemotherapy? *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013; 87: 505-11.
79. De Caluwe L, Van Nieuwenhove Y and Ceelen WP. Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013; 2: CD006041.
 80. Pettersson D, Cedermark B, Holm T, et al. Interim analysis of the Stockholm III trial of preoperative radiotherapy regimens for rectal cancer. *The British journal of surgery*. 2010; 97: 580-7.
 81. Siegel R, Burock S, Wernecke KD, et al. Preoperative short-course radiotherapy versus combined radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer: a multi-centre prospectively randomised study of the Berlin Cancer Society. *BMC cancer*. 2009; 9: 50.
 82. Pettersson D, Holm T, Iversen H, Blomqvist L, Glimelius B and Martling A. Preoperative short-course radiotherapy with delayed surgery in primary rectal cancer. *The British journal of surgery*. 2012; 99: 577-83.
 83. Pettersson D, Glimelius B, Iversen H, Johansson H, Holm T and Martling A. Impaired postoperative leucocyte counts after preoperative radiotherapy for rectal cancer in the Stockholm III Trial. *The British journal of surgery*. 2013; 100: 969-75.
 84. Bosset JF, Servagi-Vernat S, Crehange G, Azria D, Gerard JP and Hennequin C. [Rectal cancer: The radiation basis of radiotherapy, target volume]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2011; 15: 431-5.
 85. Horisberger K, Hofheinz RD, Palma P, et al. Tumor response to neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer: predictor for surgical morbidity? *International journal of colorectal disease*. 2008; 23: 257-64.
 86. Eismann N, Emmermann A and Zornig C. [Individualization of guidelines : Approach for rectal cancer in UICC stages II and III.]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizin*. 2013.
 87. West NP, Anderin C, Smith KJ, Holm T, Quirke P and European Extralevator Abdominoperineal Excision Study G. Multicentre experience with extralevator abdominoperineal excision for low rectal cancer. *The British journal of surgery*. 2010; 97: 588-99.
 88. de Bruin AF, Nuyttens JJ, Ferenschild FT, Planting AS, Verhoef C and de Wilt JH. Preoperative chemoradiation with capecitabine in locally advanced rectal cancer. *The Netherlands journal of medicine*. 2008; 66: 71-6.
 89. Huerta S. Recent advances in the molecular diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Expert review of molecular diagnostics*. 2008; 8: 277-88.
 90. Bosset JF, Collette L, Calais G, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2006; 355: 1114-23.
 91. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; 24: 4620-5.
 92. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2012; 13: 579-88.
 93. Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, et al. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010; 28: 1638-44.
 94. Schou JV, Larsen FO, Rasch L, et al. Induction chemotherapy with capecitabine and oxaliplatin followed by chemoradiotherapy before total mesorectal excision in patients with locally advanced rectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012; 23: 2627-33.

95. Chiorean EG, Sanghani S, Schiel MA, et al. Phase II and gene expression analysis trial of neoadjuvant capecitabine plus irinotecan followed by capecitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Hoosier Oncology Group GI03-53. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2012; 70: 25-32.
96. Francois Y, Nemoz CJ, Baulieux J, et al. Influence of the interval between preoperative radiation therapy and surgery on downstaging and on the rate of sphincter-sparing surgery for rectal cancer: the Lyon R90-01 randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999; 17: 2396.
97. Horisberger K and Palma P. Side effects of neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer. In: GA S, (ed.). *Rectal Cancer - A Multidisciplinary Approach to Management*. InTech Open Access Pub, 2011, p. 353-66.
98. Bosset JF, Calais G, Daban A, et al. Preoperative chemoradiotherapy versus preoperative radiotherapy in rectal cancer patients: assessment of acute toxicity and treatment compliance. Report of the 22921 randomised trial conducted by the EORTC Radiotherapy Group. *European journal of cancer*. 2004; 40: 219-24.
99. Shaib W, Lee V and Saif MW. Bolus 5-Fluorouracil as an alternative modality to infusion 5-Fluorouracil in a patient with rectal cancer and capecitabine-induced cardiotoxicity. *In vivo*. 2009; 23: 821-6.
100. Peeters KC, van de Velde CJ, Leer JW, et al. Late side effects of short-course preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients--a Dutch colorectal cancer group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005; 23: 6199-206.
101. Pollack J, Holm T, Cedermark B, et al. Late adverse effects of short-course preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The British journal of surgery*. 2006; 93: 1519-25.
102. Habr-Gama A. Assessment and management of the complete clinical response of rectal cancer to chemoradiotherapy. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2006; 8 Suppl 3: 21-4.
103. Guillem JG, Moore HG, Akhurst T, et al. Sequential preoperative fluorodeoxyglucose-positron emission tomography assessment of response to preoperative chemoradiation: a means for determining longterm outcomes of rectal cancer. *Journal of the American College of Surgeons*. 2004; 199: 1-7.
104. Cascini GL, Avallone A, Delrio P, et al. 18F-FDG PET is an early predictor of pathologic tumor response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2006; 47: 1241-8.
105. Dworak O, Keilholz L and Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *International journal of colorectal disease*. 1997; 12: 19-23.
106. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1994; 73: 2680-6.
107. Ishihara S, Watanabe T, Kiyomatsu T, Yasuda K and Nagawa H. Prognostic significance of response to preoperative radiotherapy, lymph node metastasis, and CEA level in patients undergoing total mesorectal excision of rectal cancer. *International journal of colorectal disease*. 2010; 25: 1417-25.
108. Park JW, Lim SB, Kim DY, et al. Carcinoembryonic antigen as a predictor of pathologic response and a prognostic factor in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy and surgery. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009; 74: 810-7.

109. Huh JW, Kim HR and Kim YJ. Clinical prediction of pathological complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 2013; 56: 698-703.
110. Moreno Garcia V, Cejas P, Blanco Codesido M, et al. Prognostic value of carcinoembryonic antigen level in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *International journal of colorectal disease*. 2009; 24: 741-8.
111. Yang KL, Yang SH, Liang WY, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) level, CEA ratio, and treatment outcome of rectal cancer patients receiving pre-operative chemoradiation and surgery. *Radiation oncology*. 2013; 8: 43.
112. Restivo A, Zorcolo L, Cocco IM, et al. Elevated CEA levels and low distance of the tumor from the anal verge are predictors of incomplete response to chemoradiation in patients with rectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 2013; 20: 864-71.
113. Evans J, Patel U and Brown G. Rectal cancer: primary staging and assessment after chemoradiotherapy. *Seminars in radiation oncology*. 2011; 21: 169-77.
114. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*. 2009; 45: 228-47.
115. Rau B, Hunerbein M, Barth C, et al. Accuracy of endorectal ultrasound after preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *Surgical endoscopy*. 1999; 13: 980-4.
116. Pomerri F, Pucciarelli S, Maretto I, et al. Prospective assessment of imaging after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Surgery*. 2011; 149: 56-64.
117. De Nardi P and Carvello M. How reliable is current imaging in restaging rectal cancer after neoadjuvant therapy? *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013; 19: 5964-72.
118. van der Paardt MP, Zagers MB, Beets-Tan RG, Stoker J and Bipat S. Patients Who Undergo Preoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer Restaged by Using Diagnostic MR Imaging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology*. 2013; 269: 101-12.
119. Oku S, Nakagawa K, Momose T, et al. FDG-PET after radiotherapy is a good prognostic indicator of rectal cancer. *Annals of nuclear medicine*. 2002; 16: 409-16.
120. Wieder H, Ott K, Zimmermann F, et al. PET imaging with [11C]methyl- L-methionine for therapy monitoring in patients with rectal cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2002; 29: 789-96.
121. Calvo FA, Domper M, Matute R, et al. 18F-FDG positron emission tomography staging and restaging in rectal cancer treated with preoperative chemoradiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004; 58: 528-35.
122. Capirci C, Rubello D, Chierichetti F, et al. Restaging after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal adenocarcinoma: role of F18-FDG PET. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2004; 58: 451-7.
123. Guillem JG, Puig-La Calle J, Jr., Akhurst T, et al. Prospective assessment of primary rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy using 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Diseases of the colon and rectum*. 2000; 43: 18-24.
124. Palma P, Conde-Muino R, Rodriguez-Fernandez A, et al. The value of metabolic imaging to predict tumour response after chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Radiation oncology*. 2010; 5: 119.
125. Schiepers C, Haustermans K, Geboes K, Filez L, Bormans G and Penninckx F. The effect of preoperative radiation therapy on glucose utilization and cell kinetics in patients with primary rectal carcinoma. *Cancer*. 1999; 85: 803-11.
126. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977; 74: 5463-7.

127. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT and Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 1991; 251: 767-73.
128. Moreno V and Sole X. [Use of DNA chips (microarrays) in medicine: technical foundations and basic procedures for statistical analysis of results]. *Medicina clinica*. 2004; 122 Suppl 1: 73-9.
129. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM and Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer cell*. 2002; 2: 353-61.
130. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992; 258: 818-21.
131. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 10869-74.
132. Chen X, Cheung ST, So S, et al. Gene expression patterns in human liver cancers. *Molecular biology of the cell*. 2002; 13: 1929-39.
133. Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochimica et biophysica acta*. 2000; 1471: M43-56.
134. Langer-Safer PR, Levine M and Ward DC. Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982; 79: 4381-5.
135. Tohami T, Nagler A and Amariglio N. Laboratory tools for diagnosis and monitoring response in patients with chronic myeloid leukemia. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2012; 14: 501-7.
136. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AB, C.M., Haller DG and Morrow M. *AJCC cancer staging manual*. 6 ed. New York: Springer-Verlag, 2002, p.113-37.
137. Gutiérrez Sainz JGB, J.; Alba Fernández, C.; Carrasco Muñoz, M.; Díaz Iglesias, C.; Espinosa Guzmán, E.; Gavira Iglesias, J.; Gómez España, A.; Jiménez Ojeda, M.B.; Llamas Elvira, J.M.; Moreno Torres, A.; Palacios Eito, A.; Puente Gutiérrez, J.J.; Rosado Cobián, R.; Reina Zoilo, J.J.; Ruiz Romero, J.A. *Proceso Asistencial Integrado: Cáncer Colorrectal*. Sevilla: Consejería de Salud- Junta de Andalucía, 2004.
138. Ortiz H, Codina A and en representacion del Grupo Colaborador del Proyecto V. The Spanish Association of Surgeon's audited teaching programme for rectal cancer. Results after six years. *Cirugia espanola*. 2013; 91: 496-503.
139. Tusher VG, Tibshirani R and Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 5116-21.
140. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-8.
141. Ray K, Kunsch C, Bonner LM and Robishaw JD. Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *The Journal of biological chemistry*. 1995; 270: 21765-71.
142. Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, et al. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*. 2007; 448: 445-51.
143. Belaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, et al. Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *The Journal of biological chemistry*. 1995; 270: 14568-75.
144. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD and Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *The Journal of clinical investigation*. 1998; 102: 1900-10.
145. Kim IJ, Lim SB, Kang HC, et al. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 2007; 50: 1342-53.

146. Nishioka M, Shimada M, Kurita N, et al. Gene expression profile can predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Cancer genomics & proteomics*. 2011; 8: 87-92.
147. Battle DJ, Lau CK, Wan L, Deng H, Lotti F and Dreyfuss G. The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Molecular cell*. 2006; 23: 273-9.
148. Parker NJ, Begley CG and Fox RM. Human R1 subunit of ribonucleotide reductase (RRM1): 5' flanking region of the gene. *Genomics*. 1994; 19: 91-6.
149. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K and Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 2008; 319: 195-8.
150. Gumireddy K, Li A, Gimotty PA, et al. KLF17 is a negative regulator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Nature cell biology*. 2009; 11: 1297-304.
151. Kebebew E, Peng M, Treseler PA, et al. Id1 gene expression is up-regulated in hyperplastic and neoplastic thyroid tissue and regulates growth and differentiation in thyroid cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004; 89: 6105-11.
152. Takai S, Long JE, Yamada K and Miki T. Chromosomal localization of the human ECT2 proto-oncogene to 3q26.1-->q26.2 by somatic cell analysis and fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1995; 27: 220-2.
153. Garcia-Aguilar J, Hernandez de Anda E, Sirivongs P, Lee SH, Madoff RD and Rothenberger DA. A pathologic complete response to preoperative chemoradiation is associated with lower local recurrence and improved survival in rectal cancer patients treated by mesorectal excision. *Diseases of the colon and rectum*. 2003; 46: 298-304.
154. Ruo L, Tickoo S, Klimstra DS, et al. Long-term prognostic significance of extent of rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy. *Annals of surgery*. 2002; 236: 75-81.
155. Codina Cazador A, Farres Coll R, Olivet Pujol F, et al. Clinical and oncological results of the pathological complete response in rectal cancer after neoadjuvant treatment. *Cirugia espanola*. 2013; 91: 417-23.
156. Kim DW, Lim SB, Kim DY, et al. Pre-operative chemo-radiotherapy improves the sphincter preservation rate in patients with rectal cancer located within 3 cm of the anal verge. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2006; 32: 162-7.
157. Albain KS, Paik S and van't Veer L. Prediction of adjuvant chemotherapy benefit in endocrine responsive, early breast cancer using multigene assays. *Breast*. 2009; 18 Suppl 3: S141-5.
158. Carlson JJ and Roth JA. The impact of the Oncotype Dx breast cancer assay in clinical practice: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2013; 141: 13-22.
159. Retel VP, Joore MA, Drukker CA, et al. Prospective cost-effectiveness analysis of genomic profiling in breast cancer. *European journal of cancer*. 2013.
160. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415: 530-6.
161. Pedraza V, Gomez-Capilla JA, Escaramis G, et al. Gene expression signatures in breast cancer distinguish phenotype characteristics, histologic subtypes, and tumor invasiveness. *Cancer*. 2010; 116: 486-96.
162. Sanz-Pamplona R, Berenguer A, Cordero D, et al. Clinical value of prognosis gene expression signatures in colorectal cancer: a systematic review. *PloS one*. 2012; 7: e48877.

163. Maak M, Simon I, Nitsche U, et al. Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. *Annals of surgery*. 2013; 257: 1053-8.
164. Potter M and Wiener F. Plasmacytomagenesis in mice: model of neoplastic development dependent upon chromosomal translocations. *Carcinogenesis*. 1992; 13: 1681-97.
165. Clark WH, Jr. From the melanocyte to melanoma to tumor biology. *Advances in cancer research*. 1994; 65: 113-40.
166. Lin MS, Chen WC, Huang JX, et al. Tissue microarrays in Chinese human rectal cancer: study of expressions of the tumor-associated genes. *Hepato-gastroenterology*. 2011; 58: 1937-42.
167. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005; 23: 1826-38.
168. Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, et al. Adjuvant versus neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. A progress report of a phase-III randomized trial (protocol CAO/ARO/AIO-94). *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2001; 177: 173-81.
169. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer research*. 2006; 66: 3370-4.
170. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, et al. Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2008; 6: 53-61.
171. Akiyoshi T, Kobunai T and Watanabe T. Predicting the response to preoperative radiation or chemoradiation by a microarray analysis of the gene expression profiles in rectal cancer. *Surgery today*. 2012; 42: 713-9.
172. Palma P, Cuadros M, Conde-Muino R, et al. Microarray profiling of mononuclear peripheral blood cells identifies novel candidate genes related to chemoradiation response in rectal cancer. *PloS one*. 2013; 8: e74034.
173. Baine MJ, Chakraborty S, Smith LM, et al. Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. *PloS one*. 2011; 6: e17014.
174. DePrimo SE, Wong LM, Khatry DB, et al. Expression profiling of blood samples from an SU5416 Phase III metastatic colorectal cancer clinical trial: a novel strategy for biomarker identification. *BMC cancer*. 2003; 3: 3.
175. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2001; 344: 539-48.
176. Twine NC, Stover JA, Marshall B, et al. Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer research*. 2003; 63: 6069-75.
177. Demaria S and Formenti SC. Sensors of ionizing radiation effects on the immunological microenvironment of cancer. *International journal of radiation biology*. 2007; 83: 819-25.
178. Kitayama J, Yasuda K, Kawai K, Sunami E and Nagawa H. Circulating lymphocyte is an important determinant of the effectiveness of preoperative radiotherapy in advanced rectal cancer. *BMC cancer*. 2011; 11: 64.
179. Ojima E, Inoue Y, Miki C, Mori M and Kusunoki M. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal cancer to preoperative radiotherapy. *Journal of gastroenterology*. 2007; 42: 730-6.

180. Kusunoki M, Yanagi H, Kamikonya N, Noda M and Yamamura T. Significant effects of preoperative intraluminal brachytherapy on the survival rate after resection of rectal carcinoma. *International journal of oncology*. 1996; 9: 645-51.
181. Li AL, Li HY, Jin BF, et al. A novel eIF5A complex functions as a regulator of p53 and p53-dependent apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 49251-8.
182. Jiang X, Kim HE, Shu H, et al. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science*. 2003; 299: 223-6.
183. Eschrich SA, Pramana J, Zhang H, et al. A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction of response and prognosis after chemoradiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009; 75: 489-96.
184. Su HL and Li SS. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene*. 2002; 296: 65-73.
185. Okuma T, Honda R, Ichikawa G, Tsumagari N and Yasuda H. In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999; 254: 693-8.
186. Spitzner M, Emons G, Kramer F, et al. A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2010; 78: 1184-92.
187. Shenouda SK and Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer metastasis reviews*. 2009; 28: 369-78.
188. Aslam MI, Taylor K, Pringle JH and Jameson JS. MicroRNAs are novel biomarkers of colorectal cancer. *The British journal of surgery*. 2009; 96: 702-10.
189. Faber C, Kirchner T and Hlubek F. The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2009; 454: 359-67.
190. Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, et al. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *International journal of oncology*. 2011; 39: 409-15.
191. Della Vittoria Scarpati G, Falcetta F, Carlomagno C, et al. A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012; 83: 1113-9.
192. Kheirleiseid EA, Miller N, Chang KH, et al. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy. *International journal of colorectal disease*. 2013; 28: 247-60.
193. Casado E, Garcia VM, Sanchez JJ, et al. A combined strategy of SAGE and quantitative PCR Provides a 13-gene signature that predicts preoperative chemoradiotherapy response and outcome in rectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011; 17: 4145-54.
194. Zeller K, Jegga A, Aronow B, O'Donnell K and Dang C. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biology*. 2003; 4: R69.
195. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC and Li F. The c-Myc target gene network. *Seminars in cancer biology*. 2006; 16: 253-64.
196. Vita M and Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in cancer biology*. 2006; 16: 318-30.
197. Rothberg PG, Spandorfer JM, Erisman MD, et al. Evidence that c-myc expression defines two genetically distinct forms of colorectal adenocarcinoma. *British journal of cancer*. 1985; 52: 629-32.
198. Rutkowski S, von Bueren A, von Hoff K, et al. Prognostic relevance of clinical and biological risk factors in childhood medulloblastoma: results of patients treated in the prospective multicenter trial HIT'91. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007; 13: 2651-7.

199. Donzelli M, Bernardi R, Negri C, et al. Apoptosis-prone phenotype of human colon carcinoma cells with a high level amplification of the c-myc gene. *Oncogene*. 1999; 18: 439-48.
200. Augenlicht LH, Wadler S, Corner G, et al. Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer research*. 1997; 57: 1769-75.
201. Arango D, Corner GA, Wadler S, Catalano PJ and Augenlicht LH. c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo. *Cancer research*. 2001; 61: 4910-5.
202. Mo H, Vita M, Crespin M and Henriksson M. Myc overexpression enhances apoptosis induced by small molecules. *Cell cycle*. 2006; 5: 2191-4.
203. Aamodt R, Jonsdottir K, Andersen SN, Bondi J, Bukholm G and Bukholm IR. Differences in protein expression and gene amplification of cyclins between colon and rectal adenocarcinomas. *Gastroenterology research and practice*. 2009; 2009: 285830.
204. Russo G, Zegar C and Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*. 2003; 22: 6497-507.

ANEXOS

ANEXO 1

DOCUMENTO INFORMATIVO de PARTICIPACION EN ESTUDIO CLINICO

Redactado según el Real Decreto 561/1993 de 16 de abril, BOE de 13 de mayo de 1993, y teniendo en consideración los requerimientos establecidos en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD 15/1999 de 13 de diciembre, BOE de 14 de diciembre de 1999).

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CARCINOMA DE RECTO

Objetivos del proyecto:

El objetivo de este estudio es encontrar marcadores genéticos, metabólicos y de imagen que nos permitan detectar que pacientes con neoplasia de recto responden al tratamiento con radio-quimioterapia. Mediante estos marcadores se podrá en un futuro adaptar estos largos y costosos tratamientos a los distintos pacientes con el objetivo final de mejorar los resultados oncológicos.

Metodología:

El estudio se realizará mediante análisis por chip (50.000 genes) de la expresión genética de biopsias en pacientes con neoplasia maligna de recto a los que por su estadio se les recomienda recibir tratamiento con radio-quimioterapia antes de la cirugía. Paralelamente se comparará el PET/TAC realizado para el estadiaje con un segundo inmediatamente antes de la intervención quirúrgica.

La participación en el estudio, como paciente, consiste en la toma de biopsias del recto. Las biopsias serán tanto del tumor como de la zona no tumoral del recto. Se tomarán antes y después de la radioquimioterapia. Las anteriores se realizarán junto con la ecografía endorrectal y las posteriores se tomarán de la pieza quirúrgica reseçada.

Las muestras sólo y exclusivamente se utilizarán para el estudio de este proyecto.

Los resultados obtenidos en el estudio no podrán ser utilizados más que con el fin de profundizar en el conocimiento científico del objetivo de trabajo.

Beneficios esperados y Riesgos Potenciales:

No hay ningún riesgo descrito en las tomas de biopsias.

Voluntariedad en la Participación:

La negativa a participar en este estudio NO tiene ninguna repercusión en la atención médica que se necesita.

La participación en este estudio es absolutamente VOLUNTARIA y, en cualquier momento del estudio, puede interrumpirse a voluntad del participante.

Confidencialidad:

La información de este estudio es CONFIDENCIAL y solamente será utilizada a efectos de publicaciones científicas.

Sección de Coloproctología
Servicio de Cirugía General y Ap. Digestivo

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CARCINOMA DE RECTO

Objetivos del proyecto:

Encontrar marcadores genéticos, metabólicos y de imagen que nos permitan detectar que pacientes con neoplasia de recto responden al tratamiento con radioquimioterapia antes de la resección quirúrgica. Mediante estos marcadores se podrá en un futuro adaptar estos tratamientos a los distintos pacientes con el objetivo final de mejorar los resultados oncológicos.

D./D^a.

con D.N.I. nº

de años de edad, con domicilio en
Nº. Historia Clínica:

DECLARO:

Que el Dr./Dra. me ha explicado que por mi proceso neoplásico de localización rectal, soy susceptible de recibir tratamiento con radioquimioterapia antes de la intervención quirúrgica y

CONSIENTO:

Participar en el estudio en el que se me van a extraer biopsias del tumor rectal y zona adyacente antes de la radio-quimioterapia. Estas biopsias se repetirán una vez resecada la pieza quirúrgica. Igualmente consiento la repetición del PET/TAC tras la radio-quimioterapia, inmediatamente antes de la operación quirúrgica.

Se me comunica que no hay descritos en la literatura científica efectos negativos por las biopsias o técnicas realizada.

Si por alguna razón lo deseo, puedo rechazar que se me tome una biopsia o realice el PET/TAC en cualquier momento del proceso.

La información de este estudio será confidencial y solamente usada a efectos de publicaciones científicas.

Fdo.: El Paciente /o Representante Legal

Fdo.: El Médico

ANEXO 2

257 genes cuya expresión es significativamente diferente entre pacientes con neoplasia de recto localmente avanzada que responden al tratamiento neoadyuvante frente a los no respondedores.

Nº	Nombre gen	Descripción	CodeLink ID
1	GNG4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4 (GNG4)	NM_004485.2
2	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC), mRNA	NM_002467.3
3	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) (MMP12)	NM_002426.1
4	HSPCP1	AGENCOURT_7766536 NIH_MGC_68 cDNA clone IMAGE:6022150 5'	BQ431029.1
5	STARD7	START domain containing 7 (STARD7), transcript variant 2	NM_139267.1
6	GEMIN5	gem (nuclear organelle) associated protein 5 (GEMIN5)	NM_015465.1
7	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene (ECT2)	NM_018098.4
8	CRI2	CREBBP/EP300 inhibitor 2 (CRI2)	NM_153232.3
9	AK092401.1	cDNA FLJ35082 fis, clone PLACE6005351	AK092401.1
10	NAT5	N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, <i>S cerevisiae</i>) (NAT5), transcript variant 2	NM_181527.1
11	CHMP4B	chromatin modifying protein 4B (CHMP4B)	NM_176812.3
12	BF057809.1	7k54b08x1 NCI_CGAP_GC6 cDNA clone IMAGE:3479007 3'	BF057809.1
13	FAM33A	family with sequence similarity 33, member A (FAM33A)	NM_182620.1
14	C1orf33	zd70f05r1 Soares_fetal_heart_NbHH19W cDNA clone IMAGE:346017 5' similar to contains Alu repetitive element;contains element PTR5 repetitive element	W77904.1
15	LOC151475	cDNA FLJ30454 fis, clone BRACE2009311	AK055016.1
16	TOP1MT	topoisomerase (DNA) I, mitochondrial (TOP1MT), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_052963.1
17	CR595760.1	full-length cDNA clone CS0DH004YF14 of T cells (Jurkat cell line) of Homo sapiens	CR595760.1
18	SRFBP1	serum response factor binding protein 1 (SRFBP1)	NM_152546.1
19	MGC13170	multidrug resistance-related protein (MGC13170)	NM_199250.1
20	RRM1	ribonucleotide reductase M1 polypeptide (RRM1)	NM_001033.2
21	CD81	CD81 antigen (target of antiproliferative antibody 1) (CD81)	NM_004356.3
22	TOM1L1	target of myb1-like 1 (chicken) (TOM1L1)	NM_005486.1
23	RFWD3	ring finger and WD repeat domain 3 (RFWD3), mRNA	NM_018124.3
24	MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9), transcript variant 2	NM_139068.1
25	GLCE	AGENCOURT_8120808 Lupski_dorsal_root_ganglion cDNA clone IMAGE:6178590 5'	BQ889128.1
26	CXorf39	Soares infant brain 1NIB cDNA clone IMAGp998812166	BX116609.1
27	COX11	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast) (COX11), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_004375.2
28	CASC5	nu89c01s1 NCI_CGAP_Alv1 cDNA clone IMAGE:1217856	AA662240.1
29	FAM98A	DKFZP564F0522 protein (DKFZP564F0522)	NM_015475.3
30	NOLA1	nucleolar protein family A, member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs) (NOLA1), transcript variant 1	NM_018983.2
31	TPD52L1	tumor protein D52-like 1 (TPD52L1), transcript variant 2	NM_001003395.1
32	STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18 (STMN1), transcript variant 2	NM_203399.1
33	SFRS6	splicing factor SRp55-2 (SRp55) mRNA	U30828.1
34	AGMAT	agmatine ureohydrolase (agmatinase) (AGMAT)	NM_024758.3
35	ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein (ID1), transcript variant 2	NM_181353.1
36	OIP5	Opa interacting protein 5 (OIP5)	NM_007280.1
37	BU736752.1	UI-E-Cl1-af0-b-13-0-UIs2 UI-E-Cl1 cDNA clone UI-E-Cl1-af0-b-13-0-UI 3'	BU736752.1
38	LSM5	LSM5 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S cerevisiae</i>) (LSM5)	NM_012322.1

Nº	Nombre gen	Descripción	CodeLink ID
39	UBA2	SUMO-1 activating enzyme subunit 2 (UBA2)	NM_005499.2
40	CGI-115	CGI-115 protein (CGI-115)	NM_016052.2
41	GLT28D1	glycosyltransferase 28 domain containing 1 (GLT28D1)	NM_018466.2
42	GLOXD1	hypothetical protein MGC15668 (MGC15668)	NM_032756.2
43	C17orf66	602664527F1 NIH_MGC_59 cDNA clone IMAGE:4809606 5'	BG777291.1
44	WDSOF1	WD repeats and SOF1 domain containing (WDSOF1)	NM_015420.4
45	BRCTD1	mRNA; cDNA DKFZp686E22228 (from clone DKFZp686E22228)	CR936768.1
46	N55958.1	J4702F Human fetal heart, Lambda ZAP Express cDNA clone J4702 5'	N55958.1
47	DPM1	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit (DPM1)	NM_003859.1
48	NLE1	601500740F1 NIH_MGC_70 cDNA clone IMAGE:3902817 5'	BE906938.1
49	WRB	tryptophan rich basic protein (WRB)	NM_004627.2
50	ATRN	attractin (ATRN), transcript variant 2	NM_139322.1
51	AW135639.1	UI-H-BI1-acc-f-01-0-UIs1 NCI_CGAP_Sub3 cDNA clone IMAGE:2713872 3'	AW135639.1
52	GTF2F2	general transcription factor IIF, polypeptide 2 (30kD subunit) (GTF2F2)	NM_004128.1
53	BU634151.1	UI-H-FL1-bgw-h-18-0-UIs1 NCI_CGAP_FL1 cDNA clone UI-H-FL1-bgw-h-18-0-UI 3'	BU634151.1
54	MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S cerevisiae) (MCM3)	NM_002388.3
55	RIF1	RAP1 interacting factor homolog (yeast) (RIF1)	NM_018151.3
56	FTSJ2	FtsI homolog 2 (E coli) (FTSJ2), transcript variant 2	NM_177442.1
57	NUP160	nucleoporin 160kDa (NUP160)	NM_015231.1
58	RKHD1	ring finger and KH domain containing 1 (RKHD1)	NM_203304.1
59	TM7SF3	K-EST0114256 S9SNU601 cDNA clone S9SNU601-74-H04 5'	BM838078.1
60	UPF3B	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast) (UPF3B), transcript variant 1	NM_080632.1
61	AK095831.1	cDNA FLJ38512 fis, clone HCHON2000503	AK095831.1
62	LOC158381	hypothetical protein LOC158381, mRNA (cDNA clone IMAGE:4824906), with apparent retained intron	BC035229.1
63	C4orf14	chromosome 4 open reading frame 14 (C4orf14)	NM_032313.2
64	BQ277155.1	AGENCOURT_6824167 NIH_MGC_127 cDNA clone IMAGE:5810333 5'	BQ277155.1
65	COPS4	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 4 (Arabidopsis) (COPS4)	NM_016129.2
66	C6orf166	chromosome 6 open reading frame 166 (C6orf166)	NM_018064.2
67	C14orf109	UI-E-EJ0-ahu-h-15-0-UIs1 UI-E-EJ0 cDNA clone UI-E-EJ0-ahu-h-15-0-UI 3'	BU739864.1
68	TIMM13	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast) (TIMM13), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_012458.2
69	CR621142.1	full-length cDNA clone CSODN003YE14 of Adult brain of Homo sapiens (human)	CR621142.1
70	SV2C	EST06574 Infant Brain, Bento Soares cDNA clone HIBBI28 5' end similar to Rap1B ras-related protein	T08682.1
71	ZNF137	zinc finger protein 137 (clone pHZ-30) (ZNF137)	NM_003438.1
72	ROD1	mRNA; cDNA DKFZp781I1117 (from clone DKFZp781I1117)	CR749471.1
73	BF574216.1	602131380F1 NIH_MGC_81 cDNA clone IMAGE:4271082 5'	BF574216.1
74	STX3A	HSPD23129 HM3 cDNA clone s4000125D09	F31730.1
75	PEX13	peroxisome biogenesis factor 13 (PEX13)	NM_002618.2
76	SDAD1	SDA1 domain containing 1 (SDAD1)	NM_018115.1
77	GMNN	geminin, DNA replication inhibitor (GMNN)	NM_015895.3
78	NME2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in (NME2), transcript variant 5, mRNA	NM_001018139.1
79	BM553569.1	AGENCOURT_6584538 NIH_MGC_41 cDNA clone IMAGE:5472722 5'	BM553569.1
80	PMCH	601065310F1 NIH_MGC_10 cDNA clone IMAGE:3451706 5'	BE538546.1
81	NPM3	nucleophosmin/nucleoplasmin, 3 (NPM3)	NM_006993.1

Nº	Nombre gen	Descripción	CodeLink ID
82	NDUFB5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, 16kDa (NDUFB5), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_002492.2
83	SMC1L1	KIAA0178 mRNA	D80000.2
84	ZW10	ZW10 homolog, centromere/kinetochore protein (Drosophila) (ZW10)	NM_004724.2
85	CA455253.1	AGENCOURT_10640955 NIH_MGC_126 cDNA clone IMAGE:6723568 5'	CA455253.1
86	RP11-48416.3	hypothetical protein BC015148 (LOC93081)	NM_138779.2
87	TCFL5	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix) (TCFL5)	NM_006602.2
88	FLJ20272	hypothetical protein FLJ20272 (FLJ20272)	NM_017735.3
89	DERL1	Der1-like domain family, member 1 (DERL1)	NM_024295.3
90	STMN2	cDNA FLJ34868 fis, clone NT2NE2014525, highly similar to SCG10 PROTEIN	AK092187.1
91	BQ054490.1	AGENCOURT_6771241 NIH_MGC_99 cDNA clone IMAGE:5803764 5'	BQ054490.1
92	DDX28	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28 (DDX28), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_018380.2
93	MYOHD1	myosin head domain containing 1 (MYOHD1)	NM_025109.3
94	RNF113B	ring finger protein 113B (RNF113B)	NM_178861.3
95	MGC2747	hypothetical protein MGC2747 (MGC2747)	NM_024104.2
96	BQ073592.1	AGENCOURT_7046491 NIH_MGC_101 cDNA clone IMAGE:5806429 5'	BQ073592.1
97	CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3)	NM_002090.2
98	SPAST	spastin (SPAST), transcript variant 2	NM_199436.1
99	KHK	ketohehexokinase (fructokinase) (KHK), transcript variant b	NM_006488.1
100	C2orf3	GCF2 fusion protein	AB026911.1
101	CNP	PM0-NN0046-040400-001-a07 NN0046 Homo sapiens cDNA	AW896213.1
102	SEPN1	AGENCOURT_8210468 NIH_MGC_112 cDNA clone IMAGE:6259260 5'	BQ678662.1
103	C2orf33	chromosome 2 open reading frame 33 (C2orf33)	NM_020194.4
104	TMEM41A	transmembrane protein 41A (TMEM41A)	NM_080652.2
105	PIGA	phosphatidylinositol glycan, class A (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) (PIGA), transcript variant 2	NM_020472.1
106	LOC51136	PTD016 protein (LOC51136)	NM_016125.2
107	NCBP2	nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa (NCBP2)	NM_007362.2
108	MRPL9	mitochondrial ribosomal protein L9 (MRPL9), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_031420.2
109	C15orf23	full-length cDNA clone CS0DB002YK23 of Neuroblastoma Cot 10-normalized of Homo sapiens (human)	CR602848.1
110	C18orf37	chromosome 18 open reading frame 37 (C18orf37)	NM_194281.2
111	ZNF35	zinc finger protein 35 (clone HF10) (ZNF35)	NM_003420.2
112	CR616734.1	full-length cDNA clone CS0DI027YF17 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)	CR616734.1
113	P53CSV	p53-inducible cell-survival factor (P53CSV)	NM_016399.2
114	FAHD1	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1 (FAHD1), transcript variant 2	NM_031208.1
115	FAM82B	CGI-90 protein (CGI-90)	NM_016033.1
116	UBE3A	ubiquitin protein ligase E3A (human papilloma virus E6-associated protein, Angelman syndrome) (UBE3A)	NM_000462.2
117	KRT8	K-EST0203659 L14ChoiCK0 cDNA clone L14ChoiCK0-17-A10 5'	CB147628.1
118	EIF2A	eukaryotic translation initiation factor (eIF) 2A (eIF2A)	NM_032025.2
119	POLA	yw15b01r1 Soares_placenta_8to9weeks_2NbHP8to9W cDNA clone IMAGE:252265 5' similar to gb:X60489 ELONGATION FACTOR 1-BETA (HUMAN);	H87655.1
120	C7orf24	chromosome 7 open reading frame 24 (C7orf24)	NM_024051.2

Nº	Nombre gen	Descripción	CodeLink ID
121	MRPL11	mitochondrial ribosomal protein L11 (MRPL11), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2	NM_170738.1
122	MRPL12	mitochondrial ribosomal protein L12 (MRPL12), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_002949.2
123	PPAP2C	phosphatidic acid phosphatase type 2C (PPAP2C), transcript variant 2	NM_177526.1
124	SS18L2	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 2 (SS18L2)	NM_016305.1
125	MRPS15	mitochondrial ribosomal protein S15 (MRPS15), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_031280.2
126	RAD18	RAD18 homolog (S cerevisiae) (RAD18)	NM_020165.2
127	C6orf211	chromosome 6 open reading frame 211 (C6orf211)	NM_024573.1
128	COMMD8	COMM domain containing 8 (COMMD8)	NM_017845.2
129	KIAA0241	KIAA0241 protein (KIAA0241)	NM_015060.1
130	NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III (NT5C3), transcript variant 2	NM_001002009.1
131	TEX10	testis expressed sequence 10 (TEX10)	NM_017746.1
132	SEPT10	601462916T1 NIH_MGC_67 cDNA clone IMAGE:3866354 3'	BE618882.1
133	RPUSD4	RNA pseudouridylylase synthase domain containing 4 (RPUSD4)	NM_032795.1
134	RPL5	ribosomal protein L5 (RPL5), mRNA	NM_000969.3
135	MGC11257	602435722F1 NIH_MGC_46 cDNA clone IMAGE:4553620 5'	BG337819.1
136	EXOSC2	exosome component 2 (EXOSC2)	NM_014285.4
137	PRKAR1A	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha subunit (PRKAR1A) mRNA	M33336.1
138	DRB1	developmentally regulated RNA-binding protein 1 (DRB1)	NM_152945.1
139	DARS	aspartyl-tRNA synthetase (DARS)	NM_001349.2
140	PHF22	PHD finger protein 22 (PHF22)	NM_020395.2
141	SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein variant, clone: HEP01044	AK222776.1
142	T93589.1	ye17g06s1 Stratagene lung (#937210) cDNA clone IMAGE:118042 3' similar to gb:K00558 TUBULIN ALPHA-1 CHAIN (HUMAN)	T93589.1
143	ABCB7	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7 (ABCB7), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_004299.3
144	MRPL45	mitochondrial ribosomal protein L45 (MRPL45), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_032351.3
145	HSPC196	hypothetical protein HSPC196 (HSPC196)	NM_016464.2
146	ARD1A	ARD1 homolog A, N-acetyltransferase (S cerevisiae) (ARD1A)	NM_003491.2
147	TncRNA	RC1-HT0598-140300-021-c09 HT0598 Homo sapiens cDNA	BE177702.1
148	NBLA00058	HCV NS3-transactivated protein 1 (NS3TP1)	NM_019048.1
149	NUDCD2	NudC domain containing 2 (NUDCD2)	NM_145266.4
150	PPHLN1	periphilin 1 (PPHLN1), transcript variant 3	NM_201439.1
151	SLC12A2	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2 (SLC12A2)	NM_001046.2
152	C6orf153	chromosome 6 open reading frame 153 (C6orf153)	NM_033112.2
153	C1orf109	chromosome 1 open reading frame 109 (C1orf109)	NM_017850.1
154	AI821277.1	ac26f02x5 Stratagene ovary (#937217) cDNA clone IMAGE:857595 3'	AI821277.1
155	EBPL	emopamil binding protein-like, mRNA (cDNA clone MGC:104589 IMAGE:4796715)	BC092471.1
156	DSCR2	Down syndrome critical region gene 2 (DSCR2), transcript variant 1	NM_003720.2
157	BF692405.1	602247916F1 NIH_MGC_62 cDNA clone IMAGE:4333299 5'	BF692405.1
158	INCYTE UNIQUE	INCYTE UNIQUE	INCYTE UNIQUE
159	IQWD1	yw16h05r1 Soares_placenta_8to9weeks_2NbHP8to9W cDNA clone IMAGE:252441 5' similar to gb:D00723 GLYCINE CLEAVAGE SYSTEM H PROTEIN PRECURSOR (HUMAN);contains TAR1 repetitive element ;	H87917.1
160	RTCD1	RNA terminal phosphate cyclase domain 1 (RTCD1)	NM_003729.1
161	CB049479.1	NISC_gj11b07y1 NCI_CGAP_Pr28 cDNA clone IMAGE:3271260 5'	CB049479.1

Nº	Nombre gen	Descripción	CodeLink ID
162	BQ024427.1	UI-1-BB1p-auq-g-04-0-UIs1 NCI_CGAP_PI6 cDNA clone UI-1-BB1p-auq-g-04-0-UI 3'	BQ024427.1
163	MDH1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble) (MDH1)	NM_005917.2
164	C10orf85	chromosome 10 open reading frame 85 (C10orf85)	NM_001012711.1
165	EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4 (EML4)	NM_019063.2
166	BE858761.1	7g04g08x1 NCI_CGAP_Brn23 cDNA clone IMAGE:3305534 3' similar to contains Alu repetitive element;contains element MER32 repetitive element ;	BE858761.1
167	NDUFC1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1, 6kDa (NDUFC1)	NM_002494.2
168	COL22A1	oq23c07s1 NCI_CGAP_GC4 cDNA clone IMAGE:1587180 3' similar to SW:CA24_ASCSU P27393 PROCOLLAGEN ALPHA 2(IV) CHAIN PRECURSOR	AA977081.1
169	SF3B14	splicing factor 3B, 14 kDa subunit (SF3B14)	NM_016047.3
170	POLR2K	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K, 70kDa (POLR2K)	NM_005034.3
171	CYP27B1	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1 (CYP27B1), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_000785.2
172	HNRPA3P1	D10S102=FBRNP [human, fetal brain, mRNA, 3043 nt]	S63912.1
173	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR)	NM_003879.3
174	RUVBL2	RuvB-like 2 (E coli) (RUVBL2)	NM_006666.1
175	SLA2	zp97e03r1 Stratagene muscle 937209 cDNA clone IMAGE:628156 5'	AA195893.1
176	C7orf9	chromosome 7 open reading frame 9 (C7orf9)	NM_022150.2
177	LOC134145	hypothetical protein LOC134145 (LOC134145)	NM_199133.1
178	SAAL1	hypothetical protein BC012010 (LOC113174)	NM_138421.1
179	MRPL30	mitochondrial ribosomal protein L30 (MRPL30), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	NM_145212.1
180	T91583.1	ye21g03s1 Stratagene lung (#937210) cDNA clone IMAGE:118420 3' similar to gb:M26326 KERATIN, TYPE I CYTOSKELETAL 18 (HUMAN);	T91583.1
181	STAMBPL1	associated molecule with the SH3 domain of STAM (AMSH) like protein (AMSH-LP)	NM_020799.2
182	SEC23A	Sec23 homolog A (S cerevisiae) (SEC23A)	NM_006364.2
183	C20orf9	chromosome 20 open reading frame 9 (C20orf9)	NM_016004.2
184	FUCA2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma (FUCA2)	NM_032020.3
185	HIST1H3C	histone 1, H3c (HIST1H3C)	NM_003531.2
186	KIAA1799	KIAA1799 protein (KIAA1799)	NM_032437.1
187	MGC12981	CM0-NT0132-121000-611-h05 NT0132 Homo sapiens cDNA	BF918530.1
188	SFRS4	full-length cDNA clone CS0DM006YK24 of Fetal liver of Homo sapiens (human)	CR595944.1
189	SNX6	HSPD15420 HM3 cDNA clone s4000071A08	F27470.1
190	BQ950358.1	AGENCOURT_8883158 Lupski_sciatic_nerve cDNA clone IMAGE:6200099 5'	BQ950358.1
191	MRPL1	mitochondrial ribosomal protein L1 (MRPL1), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_020236.2
192	UTP11L	UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, (yeast) (UTP11L)	NM_016037.2
193	PSMC2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2 (PSMC2)	NM_002803.2
194	BM716531.1	UI-E-EJ0-ahi-k-13-0-UIr2 UI-E-EJ0 cDNA clone UI-E-EJ0-ahi-k-13-0-UI 5'	BM716531.1
195	DSCAML1	UI-E-EJ1-ajt-a-05-0-UIr1 UI-E-EJ1 cDNA clone UI-E-EJ1-ajt-a-05-0-UI 5'	BQ187536.1
196	APC	tz39a05y1 NCI_CGAP_Brn52 cDNA clone IMAGE:2290928 5' similar to gb:X12791 19 KD PROTEIN OF SIGNAL RECOGNITION PARTICLE (HUMAN);	BE047584.1
197	LOC91137	hypothetical protein BC017169 (LOC91137)	NM_138773.1
198	STRBP	spermatid perinuclear RNA binding protein (STRBP)	NM_018387.2
199	C6orf96	chromosome 6 open reading frame 96 (C6orf96)	NM_017909.1
200	YARS2	tyrosyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial) (YARS2)	NM_015936.1
201	PRKRIP1	in24a12y1 Human Fetal Pancreas 1B cDNA clone IMAGE: 5' similar to TR:Q13401 Q13401 HPMSR3. ;	BU073748.1

Nº	Nombre gen	Descripción	CodeLink ID
202	FKBP3	FK506 binding protein 3, 25kDa (FKBP3)	NM_002013.2
203	EIF3S12	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 12 (EIF3S12)	NM_013234.1
204	BQ575336.1	UI-H-EZ1-bbe-I-13-0-UIs1 NCI_CGAP_Ch2 cDNA clone UI-H-EZ1-bbe-I-13-0-UI 3'	BQ575336.1
205	FUSIP1	cDNA FLJ30073 fis, clone ASTRO2000480	AK054635.1
206	C6orf157	chromosome 6 open reading frame 157 (C6orf157)	NM_198920.1
207	MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial) (MDH2)	NM_005918.2
208	SEMA4A	cDNA FLJ12354 fis, clone MAMMA1002329, weakly similar to Mmusculus mRNA for semaphorin B	AK022416.1
209	SYAP1	synapse associated protein 1, SAP47 homolog (Drosophila) (SYAP1)	NM_032796.2
210	FAM96B	CGI-128 protein (CGI-128)	NM_016062.1
211	SCC-112	SCC-112 protein (SCC-112)	NM_015200.1
212	BF690421.1	602186866T1 NIH_MGC_49 cDNA clone IMAGE:4298825 3'	BF690421.1
213	COMMD4	cDNA FLJ42978 fis, clone BRTHA2004821	AK124968.1
214	SS18L1	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1 (SS18L1), transcript variant 1	NM_198935.1
215	USP7	ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated) (USP7)	NM_003470.1
216	C11orf24	chromosome 11 open reading frame 24 (C11orf24)	NM_022338.2
217	C18orf55	chromosome 18 open reading frame 55 (C18orf55)	NM_014177.1
218	RPP30	ribonuclease P/MRP 30kDa subunit (RPP30)	NM_006413.2
219	C12orf10	chromosome 12 open reading frame 10 (C12orf10)	NM_021640.2
220	CBX3	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila) (CBX3), transcript variant 1	NM_007276.3
221	HBS1L	eRFS mRNA	U87791.1
222	CUL2	cullin 2 (CUL2)	NM_003591.2
223	FTH1	AGENCOURT_6613829 NIH_MGC_41 cDNA clone IMAGE:5475270 5'	BM913228.1
224	GTF2B	general transcription factor IIB (GTF2B)	NM_001514.3
225	LIG3	ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3), transcript variant alpha	NM_013975.1
226	C21orf66	cDNA clone IMAGE:5497083, containing frame-shift errors	BC062992.1
227	CCDC55	hypothetical protein DKFZp434K1421 (DKFZp434K1421)	NM_032141.1
228	RBM15B	zd37e05s1 Soares_fetal_heart_NbHH19W cDNA clone IMAGE:342848 3'	W68531.1
229	SPIN	cDNA: FLJ23402 fis, clone HEP18853	AK027055.1
230	PSMA1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1 (PSMA1), transcript variant 1	NM_148976.1
231	DN994689.1	adult whole brain, large insert, pCMV expression library cDNA clone TC114241 5' similar to Homo sapiens APC11 anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast) (ANAPC11), transcript variant 2	DN994689.1
232	RCE1	mRNA; cDNA DKFZp761D0521 (from clone DKFZp761D0521)	AL713740.1
233	C12orf5	chromosome 12 open reading frame 5 (C12orf5)	NM_020375.1
234	MRPL51	mitochondrial ribosomal protein L51 (MRPL51), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_016497.2
235	BHLHB9	cDNA FLJ30372 fis, clone BRACE2007868	AK054934.1
236	SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 165kDa (SNRPD2), transcript variant 2	NM_177542.1
237	MRPL46	mitochondrial ribosomal protein L46 (MRPL46), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_022163.2
238	CB046341.1	NISC_gf03h02x2 NCI_CGAP_Kid12 cDNA clone IMAGE:3252722 3'	CB046341.1
239	COASY	Coenzyme A synthase (COASY)	NM_025233.4
240	NIF3L1BP1	Ngg1 interacting factor 3 like 1 binding protein 1 (NIF3L1BP1)	NM_025075.1
241	BM726450.1	UI-E-EJ0-aii-c-11-0-UIr1 UI-E-EJ0 cDNA clone UI-E-EJ0-aii-c-11-0-UI 5'	BM726450.1
242	ITGA6	integrin, alpha 6 (ITGA6)	NM_000210.1
243	CDV3	AGENCOURT_14355147 NIH_MGC_191 cDNA clone IMAGE:30413831 5'	CD521865.1
244	RPL24	AGENCOURT_6826789 NIH_MGC_99 cDNA clone IMAGE:5924410 5'	BQ062869.1

Nº	Nombre gen	Descripción	CodeLink ID
245	HSPA14	heat shock 70kDa protein 14 (HSPA14)	NM_016299.1
246	MGC40405	mRNA; cDNA DKFZp5640052 (from clone DKFZp5640052)	AL833918.2
247	HDCC2	chromosome 6 open reading frame 74 (C6orf74)	NM_016063.1
248	YIPF4	Yip1 domain family, member 4 (YIPF4)	NM_032312.2
249	CKAP1	zh70f04r1 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1 cDNA clone IMAGE:417439 5' similar to gb:Z23102_rna1 DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE II 14.2 KD POLYPEPTIDE (HUMAN);	W89079.1
250	PPIL5	mRNA; cDNA DKFZp686J1525 (from clone DKFZp686J1525)	BX648029.1
251	CYP19A1	Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGp998B18114	BX102808.1
252	BM670971.1	UI-E-DW1-ahc-d-15-0-UIs1 UI-E-DW1 cDNA clone UI-E-DW1-ahc-d-15-0-UI 3'	BM670971.1
253	NSUN4	zh75c06s1 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1 cDNA clone IMAGE:417898 3'	W90137.1
254	NDUFS8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS8)	NM_002496.1
255	TREH	trehalase (brush-border membrane glycoprotein) (TREH)	NM_007180.1
256	EME1	T CELLS (JURKAT CELL LINE) cDNA clone CS0DH001YC11 3-PRIME	BX405101.2
257	WFDC12	WAP four-disulfide core domain 12 (WFDC12)	NM_080869.1

ANEXO 3

Publicaciones que avalan la presente tesis doctoral:

- The value of metabolic imaging to predict tumour response after chemoradiation in locally advanced rectal cancer. Palma P, Conde-Muíño R, Rodríguez-Fernández A, Segura-Jiménez I, Sánchez-Sánchez R, Martín-Cano J, Gómez-Río M, Ferrón JA, Llamas-Elvira JM. *Radiat Oncol.* 2010; 5:119. doi: 10.1186/1748-717X-5-119.
- Radioquimioterapia en el cáncer de recto: ¿qué debe conocer y preocupar al cirujano? Conde Muíño R., Segura Jimenez I., Huertas Peña F., Palma Carazo P. *Cir. Andal.* 2011; 22: 352-357.
- Microarray profiling of mononuclear peripheral blood cells identifies novel candidate genes related to chemoradiation response in rectal cancer. Palma P, Cuadros M, Conde-Muíño R, Olmedo C, Cano C, Segura-Jiménez I, Blanco A, Bueno P, Ferrón JA, Medina P. *PLoS One.* 2013; 8(9):e74034. doi: 10.1371/journal.pone.0074034.

Recibió el Premio de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Granada del 2010, por el trabajo científico “Tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto: marcadores metabólicos y moleculares de respuesta”, del cual fueron autores Pablo Palma Carazo, Inmaculada Segura Jimenez, Raquel Conde Muíño, Marta Cuadros, Antonio Rodríguez, Armando Blanco, Rosario del Moral, Encarnación González, Antonio Medina, José Luis Marín, Pablo Bueno, Antonio Ferrón.