

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina**



**ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN  
GÉNICA EN EL CARCINOMA COLORRECTAL:  
DESARROLLO DE BIOMARCADORES  
PREDICTIVOS DE RESPUESTA A LA  
QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON  
ENFERMEDAD AVANZADA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR**

**Purificación Estévez García**

Directora:

Rocío García Carbonero

Co-directores:

Amancio Carnero Moya

Luis Paz-Ares Rodríguez

Sevilla, 2015



# Agradecimientos

---

A lo largo del camino de esta tesis doctoral he sido consciente de la cantidad de personas que han hecho posible que este proyecto se convierta en realidad. Por eso, es una necesidad reflejar por escrito mi gratitud y reconocimiento a todas ellas.

A la Dra. Rocío García Carbonero, directora de esta tesis, por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo y demostrarme con su ejemplo que con constancia y organización es posible combinar la actividad asistencial e investigadora. Gracias por tu apoyo continuo, disponibilidad para resolver mis dudas y capacidad de encontrar soluciones para todos los problemas que han surgido en las diferentes etapas de la tesis. Tu inagotable capacidad de trabajo y dedicación a los pacientes son una motivación constante.

Al Dr. Luis Paz-Ares, codirector y Jefe de Servicio de Oncología Médica del H. Virgen de Rocío durante la realización de esta tesis. Su liderazgo y vocación médica y científica han convertido a nuestro Servicio en un referente asistencial e investigador, y son un gran estímulo para los que trabajamos a su lado. Gracias por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación clínico-básica.

Al Dr. Amancio Carnero, codirector de esta tesis y tutor durante la Beca postFSE Rio-Hortega. Gracias por aceptarme en tu grupo, guiarme en los primeros pasos en el laboratorio y prestarme las gafas de biólogo para ver la Oncología desde otro punto de vista. Tus consejos siempre acertados y tu increíble sentido práctico de la ciencia han sido una ayuda imprescindible.

Al Dr. José Villar, tutor de la tesis, por su disponibilidad y colaboración.

A los doctores Fernando Rivera y Javier Gómez del H. Marqués de Valdecilla (Santander), por aportar las muestras tumorales que han sido la base para la realización de este proyecto. Gracias por vuestra colaboración y disponibilidad.

A la Dra. Isabel Sevilla (Hospital Virgen de la Victoria, Málaga) , al Dr David Marcilla (H. Virgen del Rocío y H. Osuna, Sevilla) y a los responsables del Biobanco del H. Virgen del Rocío de Sevilla, por su colaboración en la recopilación de muestras tumorales.

A todos los miembros del grupo de Oncología Molecular y Nuevas Terapias (laboratorio 215) y Biología Molecular del Cáncer (laboratorio 214) del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), en especial a la Dra. Sonia Molina, a Rocío Suárez y Ana Salinas, por la cordial acogida en la gran familia del “labo” haciéndome sentir una más desde el primer día y por todo lo que he aprendido de vosotros. Sin vuestra ayuda no hubiera sido posible esta tesis.

A todos los miembros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Virgen del Rocío y Hospital de Osuna por su colaboración en el tratamiento y seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio, en especial al Dr. Manuel Chaves. Gracias por ser mi “guía espiritual” y mi referente profesional por tu compromiso con los pacientes y con el trabajo bien hecho.



A todos los pacientes oncológicos, por su deseo de luchar contra la enfermedad y aprovechar al máximo cada minuto, que son el motor que me impulsó a escoger esta especialidad y me anima a seguir trabajando y estudiando cada día.

A toda mi familia. A mis padres por enseñarnos a mis hermanos y a mí el valor de la responsabilidad, el trabajo y la honestidad, y animarnos siempre a elegir nuestro camino a pesar del esfuerzo que os supuso y que nunca podré agradecerlos lo suficiente.

A Eugenio. Para ti mi agradecimiento no tiene límite. Todos los objetivos profesionales y personales son alcanzables estando a tu lado, por eso no podía haber soñado con un compañero mejor para embarcarme en cualquier aventura.

A todos, gracias.



# **Abreviaturas**



# Abreviaturas

---

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ADNc: ADN complementario

ARNc: ARN complementario

CCR: cáncer colorrectal

CCRM: cáncer colorrectal metastásico

Ct: *cycle threshold* (ciclo umbral)

EE: enfermedad estable

EGFR: *epidermal growth factor receptor* (receptor del factor de crecimiento epidérmico)

EMA: *European Medicines Agency* (Agencia Europea del Medicamento)

EMS: estabilidad de microsatélites

FDA: *Food and Drug Administration*

HR: hazard ratio

IC: intervalo de confianza

ICr: inestabilidad cromosómica

IHQ: inmunohistoquímica

IMS: inestabilidad de microsatélites

iv: intravenoso

máx: máximo

miARN: microARN

mín: mínimo

min: minuto

N: tamaño muestral

ng/ $\mu$ L: nanogramos/microlitro

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*)

PE: progresión de la enfermedad

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PAF: poliposis adenomatosa familiar

PDGF: *platelet-derived growth factor* (factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PS: *Performance Status* (estado funcional)

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real (*quantitative real time-polymerase chain reaction*)

QT: quimioterapia

RECIST v1.0: *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.0*

RIN: RNA integrity number (número de integridad del ARN)

RC: respuesta completa

RP: respuesta parcial

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo

T: tumores

tam: tamaño

Taq: *Thermus aquaticus*

TNM: Tumor-Nódulo-Metástasis

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

VEGF: *vascular endothelial growth factor* (factor de crecimiento vascular endotelial)

VEGFR: *vascular endothelial growth factor receptor* (receptor del factor de crecimiento vascular endotelial)

vs: versus

V: volume





# Resumen



# Summary

---

Fluoropyrimidine-based chemotherapy (CT) has been the mainstay of care of metastatic colorectal cancer (mCRC) for years. Response rates are only observed, however, in about half of treated patients, and there are no reliable tools to prospectively identify the patients more likely to benefit from therapy.

The purpose of our study was to identify a gene expression profile predictive of CT response in mCRC. Whole genome expression analyses (Affymetrix GeneChip® HG-U133 Plus 2.0) were performed in fresh frozen tumor samples of 37 mCRC patients (training cohort). Differential gene expression profiles among the two study conditions (responders versus non-responders) were assessed using supervised class prediction algorithms. A set of 161 differentially expressed genes in responders (23 patients; 62%) versus non-responders (14 patients; 38%) was selected for further assessment and validation by RT-qPCR (TaqMan® Low Density Arrays (TLDA) 7900 HT Micro Fluidic Cards) in an independent multi-institutional cohort (53 mCRC patients). Seven of these genes were confirmed as significant predictors of response. Patients with a favorable predictive signature had significantly greater response rate (58% vs 13%,  $P=0.024$ ), progression-free survival (61% vs 13% at 1 year,  $HR=0.32$ ,  $P=0.009$ ) and overall survival (32 vs 16 months,  $HR=0.21$ ,  $P=0.003$ ) than patients with an unfavorable gene signature.

This is the first study to validate a gene-expression profile predictive of response to CT in mCRC patients. Larger and prospective confirmatory studies are required, however, in order to successfully provide oncologists with adequate tools to optimize treatment selection in routine clinical practice.

# Resumen

---

La quimioterapia basada en fluoropirimidinas ha sido la base del tratamiento del cáncer colorrectal metastásico (CCRm) durante años. Sin embargo, tan sólo aproximadamente la mitad de los pacientes tratados alcanzan respuestas tumorales objetivas y, hasta la fecha, no disponemos de herramientas fiables que permitan identificar de forma prospectiva a aquellos pacientes que presentan mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento.

El objetivo de este estudio fue la identificación de un perfil de expresión génica predictivo de respuesta a la quimioterapia en CCRm. Con este fin, se realizó la hibridación en microarrays (Affymetrix GeneChip® HG-U133 Plus 2.0) del genoma completo de muestras tumorales congeladas en fresco de una cohorte inicial de 37 pacientes con CCRm. Los perfiles de expresión génica en las dos condiciones del estudio (respondedores a la quimioterapia de primera línea versus no respondedores) se compararon mediante análisis bioinformático supervisado, identificándose un panel de 161 genes diferencialmente expresados en pacientes respondedores (23 pacientes; 62%) con respecto a los no respondedores (14 pacientes; 38%). Estos genes fueron seleccionados para su evaluación mediante qRT-PCR TaqMan® Low Density Arrays (TLDA) 7900 HT Micro Fluidic Cards) en una cohorte independiente multicéntrica que incluyó muestras de 53 pacientes. Siete de estos genes fueron validados como predictores de respuesta a quimioterapia en CCRm. Los pacientes con un perfil de expresión favorable presentaron tasas de respuesta (58% vs 13%,  $p=0.024$ ), supervivencia libre de progresión (61% vs 13% a 1 año,  $HR=0.32$ ,  $p=0.009$ ) y supervivencia global (32 vs

16 meses, HR=0.21, p=0.003) significativamente mayores que los pacientes con un perfil de expresión no favorable.

Este ha sido el primer estudio en validar un perfil de expresión génica predictivo de respuesta a la quimioterapia en pacientes con CCRm. Sin embargo, serán necesarios estudios prospectivos y con mayor número de pacientes para confirmar estos hallazgos y poder trasladar a la clínica herramientas útiles que permitan optimizar la selección del tratamiento más adecuado para cada paciente.



# Índice





# Índice

---

## INTRODUCCIÓN

### 1. Cáncer colorrectal.

#### 1.1 Epidemiología y relevancia como problema de salud

##### 1.1.1 Factores de riesgo

##### 1.1.2 Factores protectores

#### 1.2 Bases biológicas del cáncer colorrectal

#### 1.3 Presentación clínica y estadiaje del cáncer colorrectal

#### 1.4 Tratamiento sistémico del cáncer colorrectal metastásico

##### 1.4.1 Fluoropirimidinas

##### 1.4.2 Poliquimioterapia con citotóxicos convencionales

##### 1.4.3 Nuevos fármacos dirigidos frente a dianas moleculares

###### 1.4.3.1 Terapias dirigidas frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

###### 1.4.3.2 Antiangiogénicos

###### 1.4.3.3 Inhibidores multikinasa

##### 1.4.4 Otros fármacos en desarrollo

#### 1.5 Estrategia de tratamiento en el cáncer colorrectal metastásico

### 2. Perfiles de expresión génica: Utilidad clínica en cáncer colorrectal.

#### 2.1 Perfiles de expresión génica y clasificación molecular

#### 2.2 Perfiles de expresión génica pronósticos.

#### 2.3 Perfiles de expresión génica predictivos de la respuesta farmacológica

## HIPÓTESIS

## OBJETIVOS

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio
2. Población del estudio
3. Criterios de inclusión
4. Recogida de información clínica y consideraciones éticas
5. Procesamiento de las muestras: extracción y cuantificación de ARN, y evaluación de su calidad
6. Estudio de la expresión génica tumoral mediante microarrays de oligonucleótidos (cohorte de desarrollo)
  - 6.1 Síntesis de ARN complementario biotilado
  - 6.2 Hibridación del microarray
  - 6.3 Escaneado del microarray y análisis de la imagen
  - 6.4 Aplicación de herramientas bioinformáticas para identificar perfiles diferenciales de expresión génica
7. Validación de los genes diferencialmente expresados mediante PCR cuantitativa
  - 7.1 Condiciones de la qRT-PCR
  - 7.2 Análisis de resultados de la qRT-PCR
8. Análisis estadístico de las variables clínicas
9. Análisis funcional de los genes de interés

## RESULTADOS

1. Población de estudio
  - 1.1 Características de los pacientes
  - 1.2 Características de los tumores
2. Evaluación de la síntesis y purificación del ARNc previa a la hibridación en el microarray

3. Generación del microarray. Análisis de la calidad y obtención de los valores cuantitativos
4. Análisis bioinformático
  - 4.1 Evaluación de la calidad de los datos de los microarrays
  - 4.2 Normalización de los datos
  - 4.3 Análisis del perfil de expresión génica en función de la respuesta a la QT
  - 4.4 Análisis del perfil de expresión génica en función de la supervivencia
5. Selección de genes para validación
6. Validación del perfil genético predictivo de respuesta a la QT en una cohorte independiente de pacientes con CCRm
7. Clasificación predictiva de respuesta a la QT en base a la firma de 7 genes
8. Función biológica o molecular de los genes validados

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO 1: PUBLICACIONES

ANEXO 2: PATENTES

# Índice de tablas

---

Tabla 1. Clasificación TNM Cáncer colorrectal 2010 (7ª edición).

Tabla 2. Estudios de validación de las firmas genéticas pronósticas

Oncotype Dx® y ColoPrint®.

Tabla 3. Medida de la concentración y pureza del ARN de las muestras de CCRm en la cohorte inicial de desarrollo.

Tabla 4. Medida de la concentración y pureza de los ARNc tras la purificación.

Tabla 5. Características clínicas de la población de estudio y tratamiento recibido.

Tabla 6. Características tumorales de la población de estudio.

Tabla 7. Análisis de calidad de hibridación de los microarrays.

Tabla 8. Indicadores de la calidad de los datos de los arrays.

Tabla 9. Respuesta objetiva tumoral y SLP por paciente.

Tabla 10. Listado de los 161 genes seleccionados para validación.

Tabla 11. Genes predictivos de la respuesta a la QT validados mediante qRT-PCR en una cohorte independiente de pacientes con CCRm.

Tabla 12. Tasa de respuesta según la clasificación predictiva de 7 genes.

Tabla 13. Regresión de Cox para SLP y SG según la clasificación predictiva de 7 genes.

Tabla 14. Firma génica predictiva de respuesta a QT: Descripción y función de los 7 genes implicados.

# Índice de figuras

---

Figura 1. Bases moleculares de la carcinogénesis colorrectal (modificado de Fearon y Vogelstein, 1990).

Figura 2. Vías de inestabilidad genética implicadas en la carcinogénesis del CCR.

Figura 3. Estrategias de tratamiento en CCRm (Adaptado de Van Cutsem et al, 2014).

Figura 4. Ejemplo de electroferograma de ARN en la muestra 08SE237.

Figura 5. Comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los ARNc purificados.

Figura 6. Comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los ARNc fragmentados.

Figura 7. Gráficas NUSE representando el error estándar de cada sonda en cada uno de los arrays

Figura 8. Dos visiones de PCA: A) Columna izquierda: primera visión de PCA. B) Columna derecha: visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3).

Figura 9. Clúster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de la lista de 595 secuencias diferencialmente expresadas entre R y NR con un valor de  $p < 0.05$ .

Figura 10. Clúster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de la SLP de los pacientes con CCRm.

Figura 11. Genes desregulados obtenidos a partir de pacientes con CCRm estratificados en función de respuesta a la QT y de la SLP.

Figura 12. Supervivencia libre de progresión en función de la clasificación predictiva

de la firma de 7 genes.

Figura 13. Supervivencia global en función de la clasificación predictiva de la firma de 7 genes.

# Introducción





# Introducción

---

## 1. **CÁNCER COLORRECTAL**

### 1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y RELEVANCIA COMO PROBLEMA DE SALUD

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las enfermedades neoplásicas más prevalentes en los países desarrollados y constituye, por tanto, un problema de salud pública de primera magnitud. Es el cuarto tumor más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer, con una incidencia mundial de más de 1,3 millones de nuevos casos anuales, lo que supone aproximadamente el 10% del total de las neoplasias diagnosticadas, y el 8,5% del total de las muertes por cáncer (Ferlay et al, 2015). En cuanto a la distribución por sexos, representa la tercera neoplasia en frecuencia en los varones (10%), después del cáncer de pulmón y el de próstata, y la segunda en mortalidad tras el cáncer de pulmón. En mujeres, constituye la segunda neoplasia en frecuencia (9,2%) después del cáncer de mama, y la tercera en mortalidad tras el cáncer de mama y pulmón (DeAngelis et al, 2014; Ferlay et al, 2015).

En España, el CCR comprende el 14,5% del total de los tumores, con unos 32.000 casos nuevos diagnosticados anualmente, y es la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer, con 14.700 defunciones anuales (López-Abente et al, 2014). El número de casos prevalentes acumulados en los últimos cinco años es de unos 89.000, 36.000 mujeres y 53.000 hombres (Ferlay et al, 2015), y se encuentra en aumento, ya que la tasa de supervivencia a los 5 años es superior al 58% en ambos sexos (DeAngelis et al, 2014; López-Abente et al, 2014).

La incidencia más elevada de CCR se ha registrado en Australia y Nueva Zelanda, seguida de Europa occidental y Estados Unidos. No obstante, la incidencia se está estabilizando e incluso está disminuyendo en algunas de estas regiones (p.ej. Estados Unidos) probablemente como consecuencia de los programas de cribado poblacional y detección y extirpación precoz de lesiones precancerosas (Jemal et al, 2011). Por el contrario, la incidencia continua en ascenso en áreas que históricamente eran de bajo riesgo, como países de Europa del Este y el Sureste asiático. Esta tendencia parece reflejar una combinación de factores que incluyen cambios en los hábitos de vida y dietéticos, que han dado lugar, entre otras cosas, a un incremento notable del sedentarismo y de la obesidad.

En los últimos años, las tasas de mortalidad por CCR han disminuido en Estados Unidos y Europa Occidental como consecuencia de la implantación de programas de cribado y detección precoz, así como de los avances en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (Labianca et al, 2013). Sin embargo, la mortalidad continúa en aumento en los países en vías de desarrollo, particularmente en Centroamérica y Europa del Este.

### **1.1.1 Factores de riesgo**

La gran mayoría de los CCR son esporádicos (90%), y sólo el 5-10% restante está constituido por síndromes familiares hereditarios. La edad es el principal factor de riesgo para desarrollar CCR. La incidencia aumenta con los años, diagnosticándose más del 90% de los casos a partir de los 50 años (Gómez-España et al, 2009; Cámara and Romero, 2011). Los antecedentes personales o familiares de pólipos colónicos o de CCR son un importante factor de riesgo, ya que hasta en un 20% de los casos de CCR esporádico se demuestra agrupación familiar, y un

mayor riesgo de aparición de la neoplasia en familiares de primer grado. Otros factores de riesgo descritos incluyen el sexo masculino, así como diversos factores ambientales entre los que destacan el sedentarismo, la obesidad, y una dieta con exceso de proteínas o grasas animales (Brenner et al, 2014). La enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y Enfermedad de Crohn) también incrementa el riesgo de desarrollar CCR con respecto a la población general, y la magnitud de este efecto aumenta con la gravedad y extensión de la enfermedad en el tracto digestivo, así como con la duración de la misma (2% a los 10 años; y 18% a los 30 años) (Eaden et al, 2001; Andersen and Jess, 2013). El máximo riesgo lo presentan los pacientes con pancolitis, con una incidencia del 0.5-1% anual y un riesgo acumulado de desarrollar CCR a los 30 años del 30% (Gómez-España et al, 2009). La asociación entre la ingesta en exceso de alcohol o el tabaquismo y el riesgo de desarrollar CCR no ha sido claramente establecida.

Entre los síndromes de predisposición genética familiar hereditaria relacionados con el desarrollo de CCR cabe destacar el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (Síndrome de Lynch), y la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y síndromes asociados. El síndrome de Lynch es el síndrome hereditario asociado a CCR más frecuente, y representa el 3% del total de CCR (Hampel et al, 2008). Presenta transmisión autosómica dominante, se caracteriza por el inicio prematuro de CCR con inestabilidad de microsatélites, y se localiza con mayor frecuencia en colon derecho. La base genética del síndrome de Lynch es una mutación en la línea germinal de genes involucrados en la reparación de los defectos de apareamiento del ADN (*DNA nucleotide mismatch-repair system*), principalmente *MSH2* y *MLH1* (responsables de aproximadamente el 70% de las mutaciones conocidas), y con menor frecuencia, de *MSH6*, *PMS1* y *PMS2* (Abdel-

Rahman and Peltomäki, 2008). El riesgo de desarrollar CCR en portadores de estas mutaciones es del 80% a lo largo de la vida. El síndrome de Lynch se asocia también con mayor riesgo de desarrollar tumores endometriales, ováricos, gástricos, hepatobiliares, pancreáticos, de intestino delgado, del tracto urotelial alto y cerebrales. La poliposis adenomatosa familiar y otros síndromes hereditarios asociados a poliposis (Síndrome de Gardner, Síndrome de Turcot, Síndrome de poliposis adenomatosa familiar atenuada) representan menos del 1% de los CCR totales. Cada una de ellas presenta otra serie de características específicas asociadas, pero de forma conjunta están causadas por una mutación en la línea germinal del gen *APC* (*adenomatous polyposis coli*) (Fearhead et al, 2001), que provoca la aparición de cientos o miles de pólipos adenomatosos desde la infancia, desarrollando síntomas entre los 20-30 años y provocando CCR en prácticamente el 100% de los casos antes de los 55 años (Capellá and Blanco, 2009).

### **1.1.2 Factores protectores**

La extirpación endoscópica de lesiones precancerosas constituye el principal factor protector de CCR, con una reducción del riesgo mayor del 50% (Brenner et al, 2011; Elmunzer et al, 2012). Otros factores protectores establecidos son la práctica de ejercicio físico (Boyle et al, 2012), el empleo de terapia hormonal sustitutiva (Lin et al, 2012) y la toma de aspirina (Bosetti et al, 2012; Rothwell et al, 2011), que han demostrado una reducción del riesgo de entre el 20-30%.

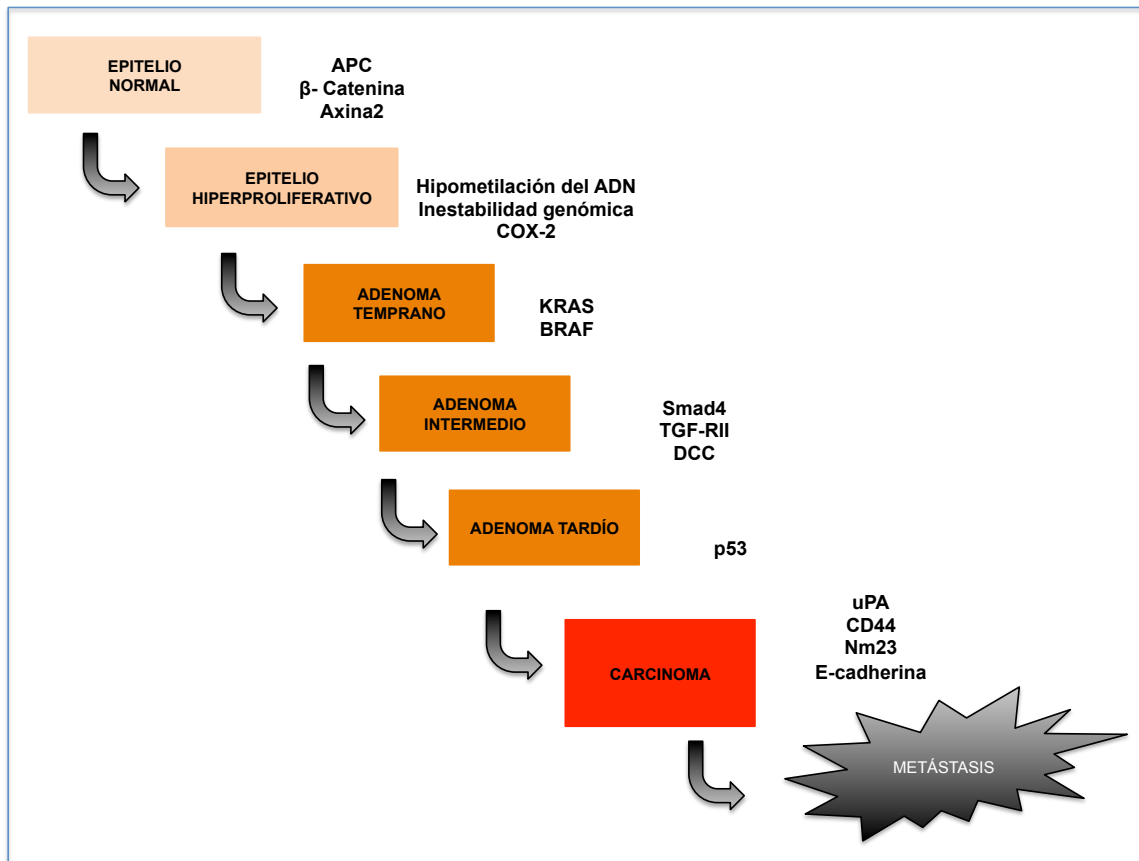
Aunque el consumo de vegetales, fruta y fibra en la dieta se ha considerado clásicamente como el principal factor protector dietético frente al CCR, aún existe controversia debido a resultados no concluyentes en dos estudios prospectivos con un elevado número de pacientes (Michels et al, 2000; Koushik et al, 2007). De igual

forma ocurre con la suplementación con ácido fólico y calcio, cuyo beneficio no ha sido claramente establecido (Cole et al, 2007; Logan et al, 2008; Wactawski-Wende et al, 2006). La presencia de niveles séricos elevados de vitamina D se ha relacionado de forma consistente con una disminución del riesgo de CCR en estudios epidemiológicos (Ma et al, 2011), pero queda por determinar si la asociación es causal y cual es la magnitud de dicha asociación.

## **1.2 BASES BIOLÓGICAS DEL CÁNCER COLORRECTAL**

Los factores etiológicos y los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo del CCR son complejos y heterogéneos. Las bases genéticas asociadas a los dos principales síndromes de predisposición hereditaria al CCR (Síndrome de Lynch y poliposis adenomatosa familiar) han permitido identificar algunas alteraciones moleculares relevantes también en la patogénesis del CCR esporádico.

La mayoría de los CCR se desarrollan a partir de pólipos adenomatosos durante un proceso que puede durar varios años o incluso décadas. Esta secuencia clásica adenoma-carcinoma de la carcinogénesis colorrectal fue descrita por Vogelstein en 1990, asociada a cambios genéticos que se correlacionaban con etapas específicas de la progresión tumoral (Fearon and Vogelstein, 1990) (Figura 1). El CCR surgiría como resultado final de una progresión guiada a través de múltiples pasos que conducen a la transformación de la célula epitelial colónica normal en neoplásica, y aunque existe una secuencia preferente, lo importante es la acumulación final de una serie de mutaciones, requiriéndose entre cinco y siete para que se desarrolle el tumor (Perea et al, 2011).

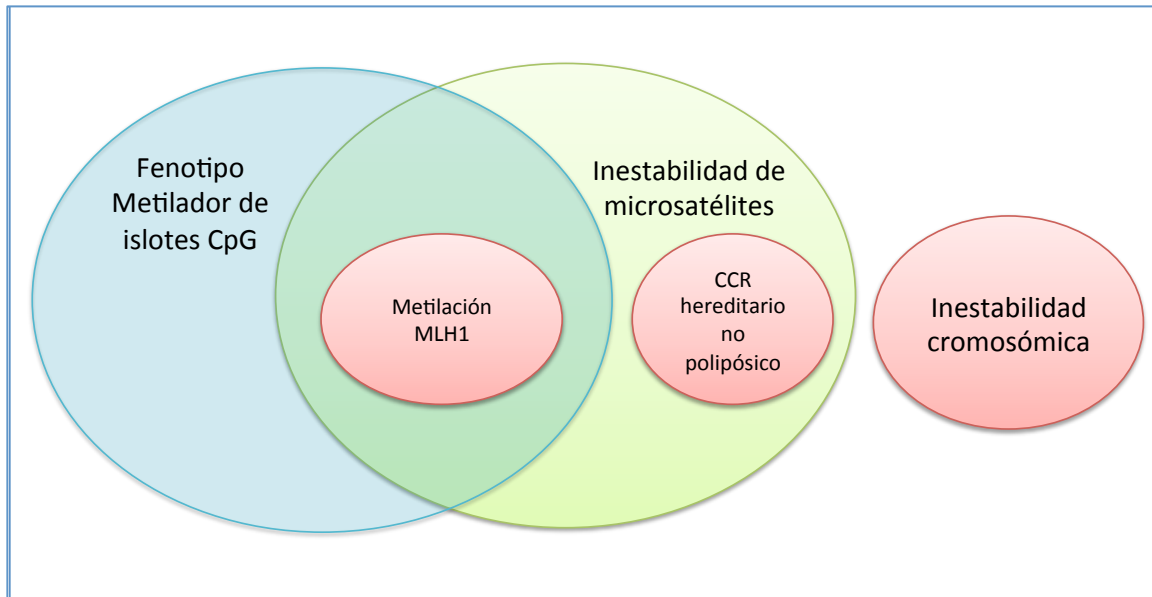


**Figura 1. Bases moleculares de la carcinogénesis colorrectal: secuencia clásica adenoma-carcinoma (modificado de Fearon y Vogelstein, 1990).**

Este modelo contribuyó a identificar los principales oncogenes (p.ej. RAS, BRAF, SMAD4, TGFβ-RII..) y genes supresores de tumores (p.ej. APC, β-catenina, TP53,..) implicados en la iniciación y progresión del CCR. Así se observó que las mutaciones inactivadoras del gen *APC* se producían en fases muy iniciales del proceso de carcinogénesis, por lo que se consideran un evento iniciador en la mayoría de los tumores colorrectales (Fearon, 2011). *APC*, calificado por Vogelstein y Kinzler como gen “portero” protector del epitelio colónico normal (Kinzler and Vogelstein, 1996), regula diversos procesos celulares, como la adhesión, la migración y la diferenciación, así como la apoptosis y la segregación cromosómica. En ausencia de ligandos de Wnt, *APC* se une a la Axina, formando un complejo proteico que promueve la fosforilación de la β-catenina para su posterior

ubiquitinización y degradación proteosómica. En condiciones fisiológicas, la activación de la vía de Wnt impide la formación de este complejo proteico y, en consecuencia, la degradación de la  $\beta$ -catenina. Las mutaciones inactivantes de la proteína APC o de la Axina, o algunas mutaciones del lugar de fosforilación de la  $\beta$ -catenina, impiden la degradación de la misma, que de esta manera se acumula y se traslada al núcleo donde activa la transcripción de sus genes diana. Las mutaciones en el gen APC, implicadas en la PAF y otros síndromes polipósicos familiares, están también presentes en el 80% de los adenomas y CCR esporádicos.

Tras la formulación de este modelo en los años 90, nuevos avances en el conocimiento molecular del CCR condujeron a su clasificación en tres fenotipos fundamentales en función de los eventos celulares predominantes y/o el factor iniciador del proceso: inestabilidad cromosómica o vía supresora, inestabilidad de microsatélites o vía mutadora, y fenotipo metilador de islotes CpG o vía “serrada” (Figura 2 y Tabla 1).



**Figura 2. Vías de inestabilidad genética implicadas en la carcinogénesis del CCR.** Interrelación entre los principales mecanismos de inestabilidad genómica en el CCR: 1) inestabilidad cromosómica, 2) inestabilidad de microsatélites provocada por defectos en el mecanismo de reparación de ADN, tanto en línea germinal (p.ej. CCR hereditario no polipósico), como somática (p.ej. metilación y silenciamiento epigenético de MLH1), y 3) fenotipo metilador de islotes CpG.

La mayoría de los CCR (85%) se desarrollan por la vía supresora o de inestabilidad cromosómica (ICr), que representa el modelo clásico elaborado por Vogelstein. Los tumores con ICr son tumores aneuploides con múltiples alteraciones cariotípicas. Son muy frecuentes las pérdidas alélicas (p.ej. en los cromosomas 8p, 17p y 18q) que dan lugar a la pérdida de expresión de genes supresores de tumores como APC, P53, o SMAD4, u otros genes implicados en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica durante la replicación celular. Al contrario que en otros cánceres, las amplificaciones en el número de copias de un gen o los reordenamientos génicos no son muy frecuentes en el CCR.

El 15% de los CCR se desarrolla por la vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites (IMS), y se caracteriza por la pérdida de función de enzimas involucradas en corregir los defectos de apareamiento del ADN (*MSH2*, *MSH3*,



*MSH6*, *MLH1* y *PMS2*), lo cual predispone al desarrollo de múltiples mutaciones en una serie de secuencias mono- o dinucleótidas altamente repetidas generalmente en regiones no codificantes del genoma (microsatélites) (Peltomaki et al, 2003). Existen dos variantes: la hereditaria (2-4%) , que se produce en el síndrome de Lynch, en la que existen mutaciones germinales inactivantes en cualquiera de los genes reparadores de ADN, siendo *MLH1* y *MSH2* los más frecuentes; y la esporádica (11-13%), debida a hipermetilación a nivel de la región promotora principalmente del gen *MLH1*. Los tumores con IMS esporádicos generalmente se desarrollan sobre adenomas serrados, presentan hipermetilación de múltiples otros genes (fenotipo metilador) y una alta frecuencia de mutación de BRAF. Tanto en la variante familiar como en la esporádica, la inactivación de genes que presentan microsatélites en su secuencia codificante (pej. TGF $\beta$ -RII, BAX) contribuye a la progresión tumoral, que es notablemente más rápida que en la vía supresora.

La vía “serrada” o fenotipo metilador (FM) está relacionada con la inactivación transcripcional debida a la metilación de islotes CpG en regiones promotoras de genes supresores de tumores. Un subgrupo de estos pacientes presentan hipermetilación de *MLH1*, que da lugar a IMS como se ha descrito previamente. La contribución del silenciamiento epigenético de otros genes (p.ej. HIC1, SRFPs..) a la carcinogénesis del CCR es motivo de intenso estudio.

En los últimos años, la introducción de técnicas avanzadas de secuenciación y análisis masivo de datos ha contribuido a esclarecer el complejo proceso de carcinogénesis, y a definir con mayor precisión las alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo del CCR. *The Cancer Genome Atlas Network* publicó en 2012 en *Nature* la caracterización molecular exhaustiva de 276 muestras de CCR, que incluyó la secuenciación del exoma, y el análisis del número de copias de DNA,

del perfil de metilación y de expresión génica de mRNA y miRNA. En este estudio se documentó que el 16% de los CCR estaban hipermutados:  $\frac{3}{4}$  partes de ellos por hipermetilación y silenciamiento de MLH1, y  $\frac{1}{4}$  parte de ellos presentaban mutaciones somáticas del sistema MMR o de la polimerasa  $\epsilon$  (POLE) (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Además de las mutaciones esperadas en los genes APC, TP53, SMAD4, PIK3CA y KRAS, se documentaron mutaciones en ARIDIA, SOX9 y FAM123B. También se identificaron amplificaciones potencialmente abordables con tratamiento farmacológico como ERBB2 e IGF2, y traslocaciones cromosómicas que fusionaban NAV2 con miembros de la vía Wnt como TCF7L1. Análisis integrativos demostraron que MYC juega un importante papel regulador de la transcripción en estos tumores.

Por otro lado, varios grupos de investigación independientes han descrito múltiples clasificaciones moleculares intrínsecas del CCR en función del perfil de expresión génica, aplicando distintos algoritmos analíticos a distintas series de casos (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Schlicker et al, 2012; Perez-Villamil et al, 2012; De Sousa et al, 2013; Budinska et al, 2013; Marisa et al, 2013; Sadanandam et al, 2013; Roepman et al, 2014). Al menos 3 subtipos moleculares han sido identificados de manera consistente por todos los grupos: 1) Un subgrupo con IMS, activación inmune, hipermutado y enriquecido en mutaciones BRAF; 2) Un subgrupo con ICr y características proliferativas epiteliales y 3) Un subgrupo con ICr y fenotipo estromal invasivo/mesenquimal (Dienstmann et al, 2014). No obstante, existe una proporción no desdeñable de casos no clasificables, y un importante solapamiento de algunas alteraciones moleculares relevantes entre los distintos subgrupos identificados. Por ejemplo, las mutaciones en KRAS están presentes en mayor o menor medida en todos los subgrupos, ilustrando la gran heterogeneidad

de estos tumores en términos de expresión génica. Recientemente, estos grupos se han unido para formar el *CRC Subtyping Consortium*, con el fin de integrar los datos moleculares y clínicos disponibles de las 7 clasificaciones más relevantes y elaborar una clasificación unificada consensuada trasladable a la clínica. Así se han establecido 4 categorías de consenso (*Consensus Molecular Signature* o CMS 1-4) que se describirán más adelante en la sección 2.1., aunque continúa sin poder clasificarse el 21% de los tumores. Si bien esta clasificación de consenso ha significado un esfuerzo colaborativo importante y sin duda un paso adelante en la clasificación molecular del CCR, en el momento actual no es una herramienta aplicable a la práctica clínica rutinaria.

A fecha de hoy, al margen de la utilidad en el consejo genético familiar de algunas de las alteraciones moleculares descritas, sólo las mutaciones en los oncogenes RAS y BRAF han demostrado una utilidad clínica. Las proteínas de la familia Ras (KRAS y NRAS) son GTPasas implicadas en la transducción de señales de múltiples rutas clave en el CCR como MAPK y PI3K al activarse por distintos estímulos, entre los que se encuentra EGFR. La aparición de mutaciones activadoras en Ras es un evento temprano en la carcinogénesis del CCR y produce estimulación celular constante de funciones oncogénicas como crecimiento, proliferación celular, desplazamiento del metabolismo celular hacia programas anabólicos que soporten el crecimiento tumoral, angiogénesis, incremento de la motilidad y potencial metastático (Prior et al, 2012). La presencia de mutaciones activadoras en KRAS (codones 12 y 13 de exón 2, codón 61 del exón 3 y codón 117 del exón 4) y NRAS (exones 2-4) se asocian con ausencia de respuesta al tratamiento con inhibidores de EGFR como cetuximab y panitumumab, fármacos que incluso pueden inducir un efecto deletéreo en pacientes mutados

particularmente en combinación con esquemas basados en oxaliplatino (Van Cutsem et al, 2014). Las mutaciones en el exón 2 de KRAS se presentan en un 40% de los CCR, y el resto de mutaciones de KRAS y NRAS aparecen en un 10-15% de los casos (Douillard et al, 2013, Stintzig et al, 2013). Las mutaciones de BRAF, presentes en un 5-10% de los CCR metastásicos, se asocian fundamentalmente con un pronóstico particularmente ominoso con independencia del tratamiento que reciban.

### **1.3 PRESENTACIÓN CLÍNICA Y ESTADIAJE DEL CÁNCER COLORRECTAL**

El CCR se diagnostica habitualmente entre la sexta y octava década de la vida, excepto en las formas hereditarias en las que aparece unos 20 años antes. Aproximadamente el 70% de los CCR se localizan en el colon, con mayor frecuencia en el izquierdo, y el 30% restante en recto o unión rectosigmoidea. El subtipo histológico más frecuentes es el adenocarcinoma (95%), un 10-15% de los cuales son de tipo mucinoso, y pueden presentarse con patrón de crecimiento exofítico, infiltrante y ulcerado. A partir de la mucosa colónica, el CCR se extiende siguiendo cuatro vías clásicas de crecimiento: diseminación local, linfática, hematógena y celómica o diseminación peritoneal. A través de la diseminación local o directa, el tumor penetra las diferentes capas de la pared colónica y posteriormente infiltra los tejidos y órganos adyacentes. La diseminación linfática se realiza habitualmente de forma escalonada siguiendo un orden anatómico ascendente que depende de la localización del tumor primario. La diseminación hematógena del CCR se realiza a través del sistema venoso mesentérico, que drena a través de la vena porta al hígado, por lo que éste es el órgano más afectado por las metástasis del CCR

(hasta en un 50% de los casos). Las siguientes localizaciones metastásicas en frecuencia son pulmón y hueso. Los tumores localizados en tercio inferior del recto, sin embargo, presentan drenaje venoso a través del sistema hemorroidal a la cava inferior, por lo que pueden producir metástasis pulmonares, óseas, cerebrales y en otros órganos en ausencia de afectación hepática.

La presentación clínica del CCR varía desde pacientes asintomáticos, donde el diagnóstico se realiza de forma casual, hasta situaciones de urgencia quirúrgica en forma de perforación u oclusión intestinal. Otros síntomas frecuentes como el sangrado intestinal, la astenia, la alteración del ritmo intestinal o el dolor abdominal difuso o localizado, dependen de la ubicación del tumor primario y de su extensión locorregional y/o a distancia. La aparición de síntomas suele asociarse con tumores de un tamaño considerable o con estadios avanzados de la enfermedad, y éstos pueden ser inespecíficos (fiebre, astenia, anorexia, pérdida de peso).

El estadiaje tumoral se realiza mediante la clasificación TNM de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que permite una categorización dual clínica (cTNM) e histopatológica (pTNM). Constituye el principal factor pronóstico y es esencial para la planificación del tratamiento del paciente. Clasifica a los tumores en función de la penetración del tumor a través de la pared intestinal, la afectación ganglionar locorregional y la extensión a otros órganos a distancia (Labianca et al, 2013). La clasificación TNM ha sido actualizada en 2010 (Edge et al, 2010)(Tabla 2), tras un análisis de más de 100.000 pacientes incluidos en el registro poblacional estadounidense *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER), que demostró diferencias significativas en supervivencia al subestratificar a los pacientes con tumores T4 y con estadios III en función del número de ganglios afectos.

**Tabla 2. Clasificación TNM Cáncer colorrectal 2010 (7ª edición).**

ESTADIO	T	N	M	
I	T1	N0	M0	T1: Invade submucosa
	T2	N0	M0	T2: Invade muscularis propia
IIA	T3	N0	M0	T3: Sobrepasa la muscularis propia e invade tejidos pericólicos
IIIB	T4a	N0	M0	T4a: Sobrepasa la superficie del peritoneo visceral
IIIC	T4b	N0	M0	T4b: Invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras vecinas. Si no hay invasión microscópica se considera entre T1 y T4a
IIIA	T1-2	N1-N1C	M0	N1a: 1 ganglio afecto N1b: 2-3 ganglios afectados N1c: Depósitos tumorales en subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirrectales no peritoneales sin metástasis ganglionares regionales
IIIB	T1	N2a	M0	N2a: 4-6 ganglios afectados
	T3-T4a	N1-N1c	M0	
	T2-T3	N2a	M0	
	T1-T2	N2b	M0	
IIIC	T4a	N2a	M0	
	T3-T4a	N2b	M0	
	T4b	N1-N2	M0	
IVA	T1-T4	N0-N2	M1a	M1a: Metástasis confinada a 1 órgano o localización
IVB	T1-T4	N0-N2	M1b	M1b: Metástasis en ≥1 órgano o localización o diseminación peritoneal

#### **1.4 TRATAMIENTO SISTÉMICO DEL CÁNCER COLORRECTAL METÁSTASICO.**

Aproximadamente un tercio de los pacientes presentan enfermedad metastásica (estadio IV) al diagnóstico, y un 40% de los diagnosticados en estadios iniciales recidivan tras la cirugía (Casado-Saenz et al, 2013). El CCRm diseminado irresecable se considera incurable, con índices de supervivencia a los 5 años menores del 10% (Brenner et al, 2014).

La QT sistémica mejora la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con CCRm, como se demostró en el meta-análisis clásico publicado en el año 2000 por la Cochrane. Este meta-análisis incluyó 1365 pacientes de 13 estudios randomizados publicados entre 1983 y 1998, en los cuales se comparaba el tratamiento con esquemas de QT basados en fluoropirimidinas con tratamiento paliativo de soporte (Best et al, 2000). El tratamiento con QT reducía significativamente el riesgo de muerte en un 35% (HR:0.65; IC 95%: 0.56-0.76), traduciéndose en un aumento de la supervivencia al año del 34% al 50%, y una mejoría de la supervivencia mediana de 8 a 11.7 meses.

#### **1.4.1 Fluoropirimidinas**

El 5-fluorouracilo (5-FU) fue el único fármaco efectivo en el tratamiento del CCR durante años desde su descubrimiento como agente antitumoral en 1957, y en la actualidad continúa siendo la base de la mayoría de los esquemas de QT empleados en el manejo de la enfermedad gracias a la optimización progresiva de su uso. En primer lugar, la modulación con ácido folínico permitió aumentar la actividad antitumoral del fármaco aunque a expensas de un discreto aumento de su toxicidad (Thirion et al, 2004). Posteriormente, la infusión intravenosa continua desplazó a la tradicional infusión rápida o “en bolo” al mejorar significativamente el índice terapéutico del fármaco, ya que aumentaba las tasas de respuesta tumoral y supervivencia y sobre todo reducía la toxicidad hematológica y gastrointestinal (Meta-analysis group in cancer, 1998). Su principal inconveniente es la necesidad de colocación de un catéter intravenoso permanente y de una bomba de infusión transportable. En los últimos años, las fluoropirimidinas orales han demostrado una eficacia similar con mejor perfil de toxicidad, conveniencia y costo-efectividad (Van

Cutsem et al, 2004), aunque existen limitaciones para su empleo, como son la incapacidad para la ingesta oral de fármacos, o el elevado riesgo de toxicidad en la combinación con irinotecan o en pacientes con insuficiencia renal.

#### **1.4.2 Poliquimioterapia con citotóxicos convencionales**

Desde los años 90, nuevos citotóxicos como el irinotecan y el oxaliplatino se incorporaron al arsenal terapéutico. Múltiples estudios de fase III demostraron que los dobletes de quimioterapia basados en fluoropirimidinas combinadas con irinotecan u oxaliplatino eran más activos que el tratamiento con fluoropirimidinas en monoterapia, prolongando la supervivencia de los pacientes hasta más de 20 meses.

El irinotecan o CPT11 fue el primer fármaco no perteneciente a la familia de las fluoropirimidinas que demostró eficacia en el tratamiento del CCRm. En combinación con distintos esquemas de 5FU/LV aumenta significativamente la tasa de respuestas tumorales (de un 21-24% a un 25-62%), el tiempo libre de progresión (de 4-6 meses a 7-9 meses) y la supervivencia global de los pacientes (de 13-17 meses a 15-20 meses) (Saltz et al, 2000; Douillard et al, 2000; Kohne et al, 2005). El oxaliplatino es el único derivado del platino con actividad significativa frente al CCRm. En distintas combinaciones con 5FU/LV en infusión continua incrementa notablemente la tasa de respuestas tumorales de un 50-60% y la supervivencia libre de progresión a 8-9 meses, pero sin haber demostrado en ensayos clínicos randomizados un beneficio significativo en supervivencia global, probablemente por el impacto que en este sentido tiene la quimioterapia de rescate en segunda y tercera línea de tratamiento (de Gramont et al, 2000; Giacchetti et al, 2000; Rothenberg et al, 2003).



Por tanto, los esquemas de QT que incluyen fluoropirimidinas y oxaliplatino o irinotecan se consideran el estándar de tratamiento para la mayoría de los pacientes con CCRm. Los dobletes de oxaliplatino y los basados en irinotecan han demostrado ser equivalentes en términos de eficacia terapéutica si se combinan con regímenes semejantes de fluoropirimidinas (5FU en infusión continua o fluoropirimidinas orales) (Tournigand et al, 2004; Giacchetti et al, 2006; Grothey et al, 2005), por lo que la diferencia fundamental entre ambos regímenes es el perfil de toxicidad: mayor diarrea y alopecia con irinotecan, y mayor neurotoxicidad con oxaliplatino (Van Cutsem et al, 2014)

### **1.4.3. Nuevos fármacos dirigidos frente a dianas moleculares**

En los últimos años, fármacos dirigidos frente a dianas moleculares específicas han demostrado su eficacia en el CCRm en combinación con QT convencional, aumentando la supervivencia de los pacientes hasta los 24-30 meses, incluso más en determinadas poblaciones molecularmente seleccionadas.

#### **1.4.3.1. Terapias dirigidas frente al receptor de crecimiento epidérmico (EGFR).**

Existen dos fármacos dirigidos al EGFR: Cetuximab, un anticuerpo monoclonal quimérico IgG1; y panitumumab, un anticuerpo monoclonal completamente humanizado IgG2. El beneficio de estos tratamientos está limitado a aquellos pacientes que no presentan mutaciones en KRAS o NRAS, por lo que la determinación del estado mutacional debe realizarse en el tejido tumoral de todos los pacientes con CCRm previo al inicio del tratamiento de primera línea (Van Cutsem et al, 2014). Tanto el cetuximab como el panitumumab han demostrado

eficacia en CCRm en primera y en sucesivas líneas de tratamiento, tanto en combinación con distintos esquemas de poliquimioterapia como en monoterapia en pacientes refractarios (Van Cutsem et al, 2014). La principal toxicidad de estos fármacos es dermatológica (>90%), e incluye dermatitis acneiforme, prurito, eritema, rash, paroniquia, sequedad de piel y fisuras cutáneas. Otras toxicidades menos frecuentes son la hipomagnesemia, astenia, y síntomas digestivos como diarrea, náuseas o vómitos. Pueden aparecer reacciones infusionales con la administración de cetuximab en un 15-20% de los pacientes, mientras que en el caso de panitumumab son mucho menos frecuentes al ser un anticuerpo completamente humanizado.

Estudiado inicialmente en pacientes quimiorrefractarios, cetuximab mostró en el estudio randomizado BOND capacidad para revertir la resistencia a irinotecan en un porcentaje significativo de pacientes. En pacientes con CCRm refractarios a quimioterapia basada en irinotecan, la combinación de irinotecan y cetuximab alcanzó tasas de respuesta del 23% frente al 11% de cetuximab en monoterapia, y mejoró la supervivencia libre de progresión de 1.5 a 4.1 meses (Cunningham et al, 2004). Asimismo, en pacientes con CCRm refractarios a fluoropirimidinas, irinotecan y oxaliplatino, el cetuximab en monoterapia demostró beneficio en supervivencia global comparado con el mejor tratamiento de soporte (9.5 meses versus 4.8 meses, HR 0.55,  $p < 0.001$ ) (Jonker et al, 2007), mientras que panitumumab consiguió mejorar la supervivencia libre de progresión pero no la supervivencia global en un estudio randomizado de similar diseño, probablemente debido a que el 75% de los pacientes asignados a la rama placebo recibieron panitumumab a la progresión (Van Cutsem et al, 2007; Amado et al, 2008). Pero recientemente, el estudio fase III ASPECCT ha demostrado la no inferioridad de panitumumab frente a cetuximab y la

obtención de un beneficio similar en supervivencia global al comparar ambos fármacos de forma directa (10.4 meses panitumumab y 10.0 meses cetuximab, HR=0.97) (Price et al, 2014).

En segunda línea, se ha demostrado un aumento en tasas de respuestas tumorales y en supervivencia libre de progresión al administrar cetuximab o panitumumab con esquemas basados en irinotecan (Sobrero et al, 2008; Peeters et al, 2010; Seymour et al, 2013).

En primera línea, ambos anti-EGFR incrementan la actividad antitumoral de la QT convencional. La combinación de panitumumab con FOLFOX aumenta la tasa de respuesta, la supervivencia libre de progresión (10,1 vs 7,9 meses) y la supervivencia global (26 meses vs 20,2 meses) (Douillard et al, 2010; Ciardiello et al, 2014; Douillard et al, 2013). El beneficio de la adición de anti-EGFR a esquemas basados en oxaliplatino parece limitarse, no obstante, a combinaciones con 5-FU en infusión continua, pero estos resultados no se han confirmado con otros esquemas como FLOX o XELOX (Bokemeyer et al, 2009; Maughan et al, 2011; Tveit et al, 2012). La combinación de FOLFIRI con cetuximab también mejora de manera significativa las tasas de respuesta, supervivencia libre de progresión y supervivencia global de los pacientes con CCRm vírgenes de tratamiento (Van Cutsem et al, 2009; Van Cutsem et al, 2011; Van Cutsem et al, 2015). Estos resultados se han ratificado recientemente en una actualización del estudio fase III CRYSTAL publicada por Van Cutsem y colaboradores. La combinación de FOLFIRI y cetuximab, comparado con el tratamiento de FOLFIRI sin anticuerpo, alcanza tasas de respuesta del 57,3% frente al 39,7%, una supervivencia libre de progresión de 9,9 frente a 8,4 meses y una supervivencia global de 23,5 frente a 20 meses.

### 1.4.3.2 Antiangiogénicos

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 dirigido frente al factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A), uno de los principales reguladores de la angiogénesis. Fue aprobado para el tratamiento del CCRm tras demostrar en el estudio fase III AVF2107 que la adición de bevacizumab al esquema IFL (5FU en bolo/LV/irinotecan) aumentaba de manera significativa las tasas de respuesta (45% frente a 35%,  $p=0.004$ ), la supervivencia libre de progresión (10.6 meses frente a 6.2 meses) y la supervivencia global (20 meses frente a 15.6 meses) de los pacientes, reduciendo el riesgo de progresión tumoral un 46% ( $HR=0.54$ ,  $p<0.001$ ) y el riesgo de muerte un 34% ( $HR=0.66$ ,  $p<0.001$ ), (Hurwitz et al, 2004). Posteriormente, múltiples estudios randomizados y varios metaanálisis (Golfopoulos et al, 2007; Wagner et al, 2009, Hurwitz et al, 2013) confirmaron que bevacizumab en combinación con regímenes de QT que incluían diversos esquemas de fluoropirimidinas (5FU en bolo o en infusión continua o fluoropirimidinas orales) solas (Cunningham et al, 2013), o combinadas con irinotecan (Fuchs et al, 2007) u oxaliplatino (Saltz et al, 2008) reduce de forma significativa el riesgo de progresión tumoral y/o de muerte comparado con QT sin bevacizumab. El mantenimiento de bevacizumab asociado a QT de segunda línea tras progresión a la primera mejora los resultados en supervivencia libre de progresión y global (Bennouna et al, 2013). La toxicidad que presenta bevacizumab es específica de clase e incluye hipertensión arterial, proteinuria, eventos trombóticos y hemorrágicos, perforación gastrointestinal y problemas en la cicatrización de heridas.

Aflibercept es una proteína de fusión recombinante humana que bloquea la actividad de VEGF-A, VEGF-B y PlGF. La combinación en segunda línea de

aflibercept con FOLFIRI fue aprobada en pacientes previamente tratados con esquemas basados en oxaliplatino, con o sin bevacizumab, al demostrar un aumento significativo en tasas de respuesta (19.8% frente a 11.1%) y supervivencia libre de progresión (6.9 frente a 4.6 meses) y global (13.5 frente a 12.06 meses) comparado con FOLFIRI (Van Cutsem et al, 2012). La toxicidad de aflibercept es la específica de clase de los fármacos antiangiogénicos, destacando la hipertensión y la proteinuria.

Ramucirumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 dirigido frente a VEGFR-2, que impide la unión de su ligando natural VEGF. Ha sido recientemente aprobado por la EMA como tratamiento para el adenocarcinoma gástrico y de la unión esófago-gástrica. En CCRm, la combinación de ramucirumab más FOLFIRI en pacientes que habían progresado a primera línea de tratamiento con 5FU, oxaliplatino y bevacizumab, ha demostrado mejorar significativamente la supervivencia global (13.3 frente a 11.7 meses; HR=0.84, p=0.02) y la supervivencia libre de progresión (5.7 vs 4.5 meses; HR=0.79, p=0.0005) comparado con placebo y FOLFIRI (Tabernero et al, 2015). Los efectos secundarios más frecuentes fueron los esperables de la combinación de la QT basada en irinotecan con el tratamiento antiangiogénico (neutropenia, diarrea, astenia e hipertensión).

Los estudios realizados con los distintos fármacos antiangiogénicos confirman el beneficio de continuar el tratamiento en líneas sucesivas de QT. Sin embargo, aún está por resolver el principal problema que presentan estos fármacos, que es la ausencia de biomarcadores predictivos de respuesta.

### **1.4.3.3 Inhibidores multikinasa**

Regorafenib es un inhibidor multikinasa oral con actividad frente a VEGFR1-3, KIT, PDGFR, RET y FGFR. Fue aprobado en 2013 por la EMA para el tratamiento de pacientes que han fracasado a todos los fármacos activos tras demostrar un aumento significativo en supervivencia global frente a placebo (6.4 versus 5 meses, HR: 0.77) en el estudio fase III CORRECT (Grothey et al, 2013). Estos datos se han confirmado posteriormente en el ensayo CONCUR realizado en población asiática (Li et al, 2015). Las principales toxicidades del fármaco incluyen eritrodisestesia palmoplantar, astenia, diarrea, hipertensión arterial y rash cutáneo.

### **1.4.4 Otros fármacos en desarrollo**

TAS-102 es un citotóxico oral que ha demostrado eficacia en pacientes con CCRm refractarios a tratamiento. Está compuesto por un análogo de nucleósidos derivado de la timidina, la trifluridina, y el inhibidor de timidina fosforilasa tipiracil en una proporción molar 1:0.5. La trifluridina se incorpora como falso metabolito al ADN, y el tipiracilo impide la degradación de la trifluridina en el tracto digestivo, mejorando así su biodisponibilidad oral. Un estudio fase II japonés demostró un aumento significativo de la supervivencia global en los pacientes tratados con TAS-102 comparados con placebo (9 vs 6.6 meses; HR=0.56; p=0.0011) (Yoshino et al, 2012). Más recientemente, el ensayo RECOURSE de fase III ha confirmado estos resultados, con un incremento significativo de la supervivencia global en los pacientes tratados con TAS-102 comparado con placebo (7.1 vs 5.3 meses; HR=0.68 95% CI 0.58-0.81) (Mayer et al, NEJM 2015). La toxicidad más frecuente fue hematológica y digestiva en grado leve o moderado en la mayoría de los casos,

lo que indica la seguridad del fármaco en estos pacientes politratados y habitualmente frágiles.

## **1.5 ESTRATEGIA DE TRATAMIENTO EN EL CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO**

La estrategia terapéutica y los objetivos del tratamiento deben ser establecidos en cada paciente en base a diversos factores, como son la localización y extensión tumoral, la resecabilidad del tumor primario y de la enfermedad metastásica, las características biológicas del tumor, los síntomas derivados de la enfermedad y las características clínicas del paciente (edad, performance status, contexto sociofamiliar, preferencias personales y comorbilidades). En base a todo ello, la European Society of Medical Oncology (ESMO) recomienda clasificar a los pacientes en uno de los 4 grupos que se describen a continuación. La evaluación del paciente en el seno de un comité multidisciplinar es en todos caso fundamental para seleccionar adecuadamente aquellos pacientes tributarios de abordaje quirúrgico con intención curativa (grupos 0 y 1).(Van Cutsem et al, 2014):

- Grupo 0: Pacientes con metástasis hepáticas o pulmonares resecables de inicio sin datos biológicos de mal pronóstico (como puede ser la progresión durante la QT adyuvante). La cirugía es la estrategia terapéutica fundamental, sobre todo si el paciente presenta metástasis de tamaño y número reducido, ya que la magnitud del beneficio de QT perioperatoria en este contexto es limitado. Los esquemas con fluoropirimidinas, solos o en combinación con oxaliplatino (esquema FOLFOX) han demostrado beneficio en supervivencia libre de progresión, pero sin traducirse en un aumento significativo de supervivencia global (Nordlinger et al, 2013; Mitry et al,

2008).

- Grupo 1: Pacientes con enfermedad metastásica potencialmente resecable con intención curativa. El objetivo es alcanzar la máxima reducción del tamaño tumoral posible para hacer posible una cirugía radical secundaria que posibilite la curación del paciente. El tratamiento más efectivo en esta situación sería un doblete o triplete de QT convencional combinado con terapias dirigidas. En pacientes con mutación en RAS, el esquema incluiría un doblete o triplete de QT en combinación con bevacizumab. En pacientes con RAS nativo, aunque se suele preferir combinar la QT con anti-EGFR porque en general estos fármacos se han asociado a una mayor tasa de respuestas objetivas que los antiangiogénicos, esta superioridad no ha sido definitivamente confirmada en ensayos randomizados comparando ambas estrategias terapéuticas entre sí (Venook et al, 2014, Heinemann et al, 2014). El empleo de FOLFOXIRI sólo o en combinación con bevacizumab es otra alternativa a considerar en este contexto.

- Grupo 2: Pacientes con enfermedad diseminada técnicamente irresecable y candidatos a tratamiento intensivo. El objetivo del tratamiento es paliativo, aunque la reducción de la masa tumoral en estos enfermos contribuye a un mejor control de síntomas y prolonga la supervivencia. La opción de tratamiento en general más recomendada es un doblete de QT con bevacizumab, ya que posibilita la administración de mayor cantidad de fármacos a lo largo del tratamiento crónico de esta enfermedad, y su perfil de toxicidad es más favorable que el de los anti-EGFR. Por otro lado, los anti-EGFR han demostrado ser tan eficaces en pacientes refractarios como en primera línea, mientras que el bevacizumab no se ha evaluado en líneas avanzadas de tratamiento. No obstante, en pacientes RAS nativos la combinación con anti-EGFR es otra opción a valorar en primera línea. Se han



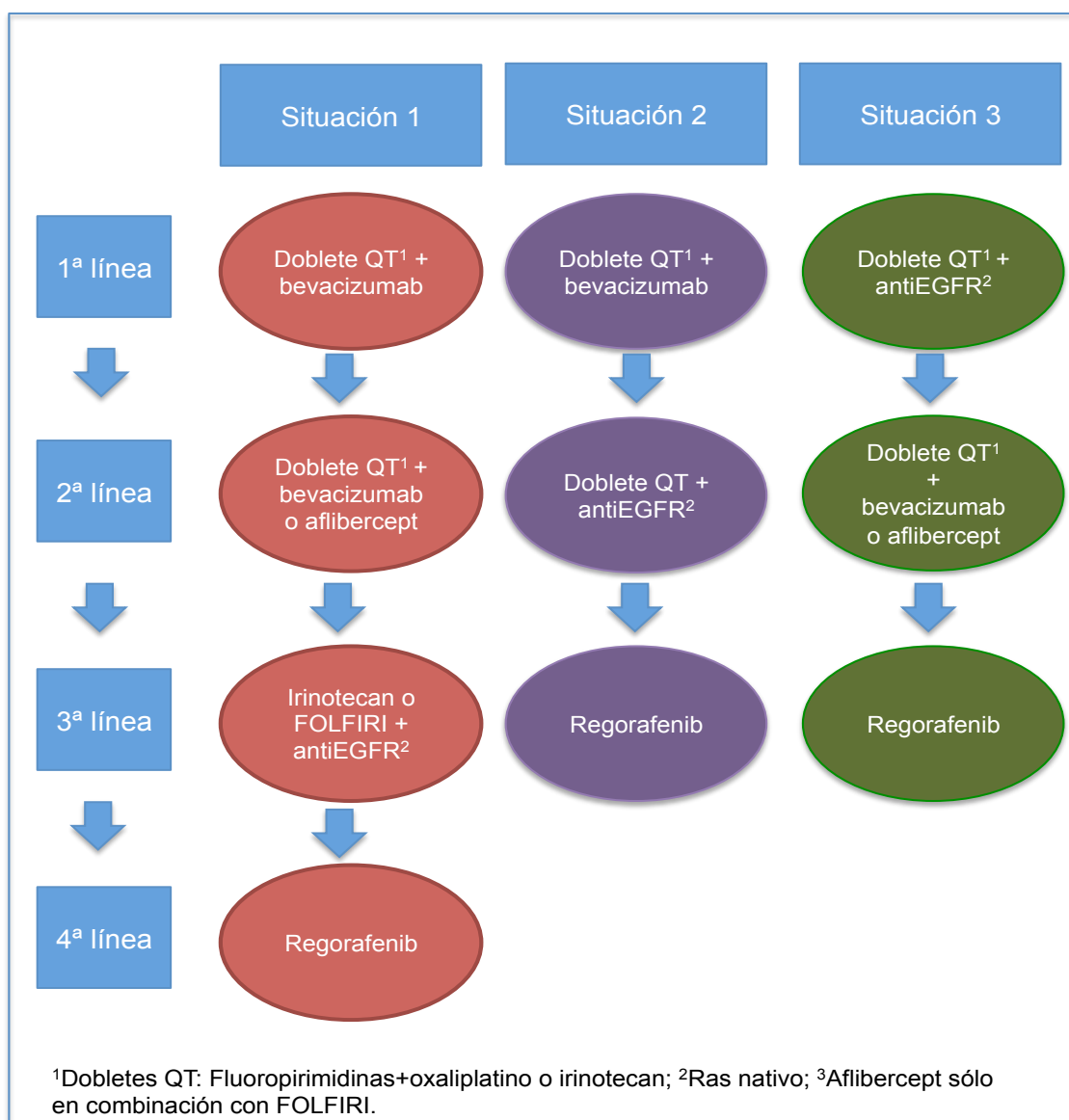
publicado tres estudios con el objetivo de establecer la primera línea de QT en combinación con terapias dirigidas en pacientes K-RAS nativos (exón 2). Todos ellos han realizado análisis *a posteriori* en la subpoblación de pacientes con análisis extendido de RAS (K- y N-RAS, exones 2-4). El ensayo CALGB 80405 evaluó la adición de bevacizumab o cetuximab a QT (FOLFOX o FOLFIRI, a elección del investigador) en 1140 pacientes. En la subpoblación RAS nativa, los pacientes del grupo de cetuximab y los de bevacizumab presentaron una supervivencia global mediana similar (32.0 frente a 31.2 meses), aunque sí se demostró mejoría en tasas de respuesta en los pacientes tratados con cetuximab (68.6% frente a 53.6%,  $p < 0.01$ ). En el subanálisis realizado en función de la quimioterapia recibida, los pacientes tratados con FOLFOX y cetuximab presentaron tendencia hacia una mayor supervivencia global comparado con los tratados con FOLFOX+bevacizumab, mientras que no se hallaron diferencias en los pacientes tratados con FOLFIRI (Venook et al, 2014). El estudio fase III FIRE-3 evaluó la eficacia de FOLFIRI y cetuximab frente a FOLFIRI y bevacizumab en 592 pacientes. La combinación con cetuximab no demostró diferencias significativas en las tasas de respuesta (62% frente a 58%,  $p = 0.18$ ), el objetivo principal del estudio, ni tampoco en la supervivencia libre de progresión (10.0 vs 10.3 meses,  $p = 0.55$ ) comparado con bevacizumab, aunque el esquema con cetuximab sí presentó mejoría de la supervivencia global (KRAS nativo (exón 2): 28.7 vs 25 meses,  $p = 0.017$ ; K- y N-RAS nativo (exones 2,3 y 4): 33.1 vs 25.6 meses,  $p = 0.011$ ) (Heinemann et al, 2014). El estudio PEAK es un ensayo fase II que comparó en pacientes con CCRm KRAS nativo (exón 2) el tratamiento con la combinación de FOLFOX+panitumumab frente a FOLFOX+bevacizumab. En este estudio no se observaron diferencias significativas entre ambas ramas en cuanto a supervivencia

libre de progresión, pero la adición de panitumumab demostró mejorar de forma significativa la supervivencia global (34.2 versus 24.3 meses en la rama de panitumumab versus bevacizumab, respectivamente; HR 0.62; P = .009). En el subgrupo de pacientes K- y N-RAS nativos (exones 2, 3 y 4), tanto la supervivencia libre de progresión (13.0 frente a 9.5 meses, HR 0.65, p=0.029) como la supervivencia global (41.3 versus 28.9 meses, HR 0.63; P= .058) fueron más favorables en la rama de panitumumab que en la de bevacizumab (Schwartberg et al, 2014). En aquellos pacientes que responden al tratamiento, existen varias opciones terapéuticas para prolongar la supervivencia libre de progresión, que incluyen diversas técnicas ablativas en el caso de enfermedad oligometastásica, o la administración de tratamiento de mantenimiento.

- Grupo 3: Pacientes con enfermedad diseminada irresecable candidatos a tratamiento no intensivo o secuencial. El objetivo del tratamiento es el control de síntomas, e intentar retrasar la progresión tumoral y prolongar la supervivencia sin deteriorar la calidad de vida. El tratamiento se establece considerando con el paciente el riesgo-beneficio, y entre las opciones más recomendables se contempla la monoterapia con fluoropirimidinas con escalada posterior si existe buena tolerancia, o el tratamiento con dobletes de citotóxicos con o sin agentes biológicos.

En resumen, existen a día de hoy múltiples fármacos activos para el tratamiento del CCRm (fluoropirimidinas, irinotecan, oxaliplatino, cetuximab, panitumumab, bevacizumab, aflibercept, ramucirumab, regorafenib, TAS102), y cada uno de ellos contribuye de manera independiente a reducir el riesgo de progresión tumoral y de muerte en estos pacientes. Con independencia de la combinación o secuencia elegidas, la exposición del paciente a todos y cada uno de estos fármacos en algún momento de la evolución de la enfermedad se asocia a

supervivencias más prolongadas (Tournigand et al, 2004; Grothey et al, 2005). Por tanto, el manejo óptimo de estos pacientes debe incluir el empleo, simultáneo o secuencial, de todos o gran parte de estos fármacos activos, siempre que la situación funcional del paciente y la historia natural de la enfermedad así lo permita. En la Figura 3 se resumen distintos escenarios y la posible secuencia de administración de fármacos a lo largo de la historia de la enfermedad.



**Figura 3. Estrategias de tratamiento en CCRm (Adaptado de Van Cutsem et al, 2014).**

## **2. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA: UTILIDAD CLÍNICA EN CÁNCER COLORRECTAL**

El análisis masivo de la expresión génica en distintas condiciones ha supuesto una revolución en el mundo científico, ya que permite, por un lado, identificar las interrelaciones entre los genes, y, por otro, aporta información biológica global fundamental que permite conocer mejor los complejos mecanismos moleculares implicados en distintos procesos biológicos de interés. El análisis de los perfiles de expresión génica ha demostrado en las dos últimas décadas incrementar la precisión diagnóstica, pronóstica y predictiva en diversas patologías neoplásicas (van't Veer and Bernards, 2008). Desde el punto de vista diagnóstico, los patrones de expresión génica han sido capaces de revelar subgrupos moleculares previamente desconocidos dentro de determinadas categorías histológicas, y de proponer nuevas clasificaciones taxonómicas. Pero lo más atractivo desde el punto de vista clínico, es que patrones diferenciales de expresión génica han permitido identificar distintos subgrupos de pacientes, en el contexto de diversas enfermedades neoplásicas (p.ej. mama, linfoma, hipernefoma, pulmón), con distintas probabilidades de recidiva tumoral o supervivencia, entre los que destacan los test pronósticos Mammaprint y Oncotype Dx en cáncer de mama por su aplicabilidad clínica (Buyse et al, 2006; van't Veer et al, 2002). Por otro lado, los perfiles de expresión génica parecen ser capaces de predecir la respuesta de diversas enfermedades neoplásicas a distintos agentes citotóxicos, como la respuesta de la leucemia linfoblástica aguda al imatinib, o del cáncer de mama a los taxanos, antraciclinas o fluoropirimidinas (Staunton et al, 2001; Pusztai et al, 2003).

Los perfiles de expresión génica también han sido ampliamente estudiados en el CCR y su potencial aplicación clínica ha sido evaluada en estos tres campos (Nannini et al, 2009).

## **2.1. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y CLASIFICACIÓN MOLECULAR**

El estudio de los perfiles de expresión génica tumoral ha conducido a un conocimiento más profundo de la carcinogénesis y evolución del CCR, mediante la identificación de firmas génicas que pueden asistir en el diagnóstico y detección precoz, porque discriminan la célula normal de la tumoral, definen la progresión en la secuencia adenoma-carcinoma, y establecen nuevas clasificaciones tumorales intrínsecas de potencial relevancia clínica.

En 1987, Augenlicht y colaboradores demostraron que los perfiles de expresión génica podían diferenciar entre tejido colónico normal, adenomas benignos y adenocarcinomas (Augenlicht et al, 1987). Desde entonces, múltiples trabajos han confirmado la capacidad de los patrones de expresión génica para discernir entre tejido colónico normal y tumoral, tumores colónicos benignos o malignos, así como adenocarcinomas colorrectales en distintos estadios histopatológicos (Alon et al, 1999; Bertucci et al, 2004; Birkenkamp-Demtroder et al 2002; Clarke et al, 2003; Frederiksen et al, 2003; Zou et al 2002).

En 2012, *The Cancer Genome Atlas Network* publicó la caracterización molecular exhaustiva de 276 muestras de CCR, que incluyó la secuenciación del exoma, el análisis del número de copias de DNA, y de los perfiles de metilación y de expresión génica de mRNA y miRNA, confirmando que el CCR comprende una compleja red de alteraciones genéticas que provoca la disregulación de múltiples

vías de señalización celular. Además de las mutaciones descritas en detalle previamente (sección 1.2.), análisis integrativos demostraron que MYC juega un importante papel regulador de la transcripción en estos tumores.

En los últimos años, varios grupos independientes han propuesto distintas clasificaciones moleculares del CCR a partir de perfiles de expresión génica, pero presentan como inconveniente una gran heterogeneidad tanto metodológica como en las cohortes de pacientes incluidas. Con el objetivo de establecer una categorización única que facilite la aplicación clínica, el *Colorectal Cancer Subtyping Consortium* ha realizado un análisis integrado de las siete clasificaciones más relevantes y que agrupan los datos de más de 4500 tumores. Así se han estableciendo cuatro subtipos moleculares de consenso del CCR (CMS1-4), que integran datos clínicos (edad, sexo, estadio tumoral, localización del tumor primario, supervivencia libre de enfermedad y global) y datos moleculares (análisis de la inestabilidad de microsatélites, la inestabilidad cromosómica, el estado mutacional KRAS y BRAF, y la activación de vías de señalización celular relevantes). El grupo CMS1 (13% de los CCR) se identifica con frecuencia en mujeres, edad avanzada y en tumores localizados en colon derecho; y se caracteriza por presentar alta inestabilidad de microsatélites, alta tasa de mutaciones tumorales, mutación BRAF y activación inmune. El grupo CMS2 es el más frecuente (35% de los CCR) y se identifica con tumores localizados en colon izquierdo. Presenta características epiteliales, estabilidad de microsatélites, alta inestabilidad cromosómica, mutación de *TP53* y activación de la vía WNT/MYC. CMS3 (11% de los CCR) muestra características epiteliales, variabilidad en cuanto a inestabilidad cromosómica y de microsatélites, frecuente mutación de KRAS y sobreexpresión de *IGFBP2*. El grupo CMS4 (20%) se observa con frecuencia en pacientes jóvenes y estadios avanzados.

Este subgrupo de tumores presenta un fenotipo mesenquimal, variabilidad en cuanto a inestabilidad cromosómica y alta inestabilidad de microsatélites, y frecuente activación de *TGFβ/VEGF* y sobreexpresión de *NOTCH3*. Un 21% de los CCR no pudieron ser clasificados en ninguno de los grupos anteriores, y pueden presentar infiltración inmune y del estroma, y activación variable de la vía de transición epitelio-mesénquima (Dienstmann et al, 2014). Esta clasificación asocia implicaciones pronósticas. El grupo CMS4 presentó peor supervivencia libre de recidiva comparado con CMS1 (HR=1.8, p=0.01) y CMS2 (HR=1.6, p=0.0006), así como peor supervivencia global comparado con CMS2 (Hr 1.7, p=0.0004). Estudios futuros determinarán si esta clasificación es implementada de forma universal.

## **2.2. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA PRONÓSTICOS**

El objetivo de los estudios genómicos pronósticos es identificar perfiles diferenciales de expresión que permitan predecir la evolución clínica de la enfermedad (en este caso, riesgo de recidiva o progresión tumoral y riesgo de muerte) con independencia del tratamiento recibido. Se han publicado múltiples firmas genómicas capaces de seleccionar con gran precisión a aquellos pacientes con mayor riesgo de recurrencia tras la resección de un CCR estadio II o III (Wang et al, 2004; Eschrich et al, 2005; Arango et al, 2005; Sinicrope et al, 2015). En cuanto al CCRm, un trabajo publicado por Cavalieri y colaboradores que incluyó pacientes con CCR estadio III y IV, obtuvo una firma de 8 genes significativamente relacionados con la supervivencia y que se correlacionaban con 48 vías de señalización diferencialmente reguladas en los pacientes de buen y mal pronóstico (Cavalieri et al, 2007). Otros dos estudios han definido perfiles de expresión que

predicen el riesgo de metástasis en pacientes intervenidos de CCR (D'Arrigo et al, 2005; Yamasaki et al, 2007).

Las dos únicas firmas genéticas comercializadas en la actualidad, y que presentan una mayor validez clínica al incluir un amplio tamaño muestral y haber sido validadas en cohortes independientes, son Oncotype Dx® y ColoPrint®. Oncotype Dx® de CCR es una firma génica desarrollada a partir de muestras de pacientes con CCR estadio II y III incluidos en los ensayos clínicos NSABP C-01/C-02/C-04/C-06 y CCF (O'Connell et al, 2010). Se identificaron 7 genes con valor pronóstico y 6 con valor predictivo. La validación se realizó mediante el análisis prospectivo de 1436 muestras de pacientes participantes en el ensayo QUASAR. Se confirmó el valor pronóstico de esta firma, estableciéndose 3 categorías de riesgo (alto, intermedio y bajo) en función de las tasas de recaída a los 3 años (22, 18 y 12%, respectivamente;  $p=0.046$ ), mientras que el valor predictivo no pudo ser validado y compromete su utilidad clínica (Gray et al, 2011).

Posteriormente, se han realizado otras validaciones de Oncotype Dx® que confirman la utilidad pronóstica de la firma. El análisis de 162 muestras procedentes de pacientes incluidos en el ensayo CALGB9581 demostró la capacidad de la firma para predecir el riesgo de recurrencia en pacientes con CCR estadio II ( $p=0.013$ ). En el análisis multivariante, Oncotype Dx® fue el principal predictor de recidiva tumoral ( $p=0.004$ ) independientemente del estadio, presencia o no de inestabilidad de microsatélites, número de ganglios linfáticos extirpados, grado histológico y presencia o no de afectación linfovascular. La mayor capacidad discriminativa se observó en los pacientes T3 con estabilidad de microsatélites, al identificarse diferencias significativas en el riesgo de recurrencia a 5 años entre el grupo de bajo



riesgo según la firma genética (13% [CI 95% 10%-16%]) y el de alto riesgo (21% [CI 95% 16-26%])(Venook et al, 2013).

También se ha comprobado la validez pronóstica de Oncotype Dx® en 892 muestras de pacientes incluidos en el ensayo NSABP C-07, que evaluó el beneficio de la quimioterapia adyuvante con 5FU+oxaliplatino comparada con 5FU en monoterapia en pacientes con CCR estadio II y III. La firma genética predijo el riesgo de recurrencia, así como la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global ( $p < 0.001$  en las tres variables). En el análisis multivariante, además de la firma genética, el estadio T y N y el estado de microsatélites se asociaron de forma significativa con el riesgo de recurrencia, por lo que la combinación de todas estas variables aportaría una mayor precisión pronóstica en la clínica (Yothery et al, 2013).

La utilidad de Oncotype Dx® como predictor de recidiva tumoral en estadios II y III de CCR ha quedado establecida tras su validación en un número considerable de pacientes incluidos en los tres ensayos. La principal ventaja de este test es la posibilidad de realizarlo en muestras tumorales parafinadas, además de haber demostrado una gran reproducibilidad y precisión (Clark-Langone et al, 2010). Entre sus limitaciones destaca la escasa capacidad discriminatoria entre las distintas categorías (alto, medio y bajo riesgo), ya que la diferencia de riesgo de recidiva entre el grupo de bajo y alto riesgo es sólo del 10%, y la baja probabilidad de recaída incluso en el grupo identificado como de alto riesgo.

ColoPrint® es una firma de 18 genes que determina el alto o bajo riesgo de recaída de pacientes diagnosticados de CCR independientemente de los factores clinicopatológicos clásicos. Los resultados fueron validados en una serie independiente, demostrándose el valor pronóstico de ColoPrint® en la supervivencia

libre de recaída (HR:2.69; IC 95%: 1.41-5.14; p=0.003) fundamentalmente en pacientes en estadio II (HR 3.34; p=0.017) (Salazar et al, 2011), y otra serie posterior obtuvo resultados similares (Maak et al, 2013). Recientemente se ha publicado un análisis combinado que integra todos estos datos. El 63% de los pacientes fueron clasificados en el grupo de bajo riesgo, y el 37% en el de alto riesgo, confirmándose una diferencia significativa entre ambos en el riesgo de recaída a los 5 años (10% en bajo riesgo vs 21% en alto riesgo; HR=2.16; p=0.004). En el análisis multivariante, que incluyó el número de ganglios linfáticos extirpados y la existencia o no de inestabilidad de microsatélites, ColoPrint® mantuvo la significación estadística (HR=2.41; p=0.005), demostrando que es una herramienta que mejora significativamente la precisión pronóstica respecto a los sistemas de clasificación convencionales. De esta manera, ColoPrint® permite identificar un subgrupo de pacientes estadio II con mayor riesgo de recaída, independientemente de la presencia o no de inestabilidad de microsatélites y/o de otros factores de riesgo clínicos o patológicos, a los cuales es más razonable plantear un tratamiento quimioterápico complementario a la cirugía (Kopetz et al, 2015). Aunque ColoPrint® ha demostrado ser un test robusto y reproducible, su utilidad clínica necesita ser confirmada mediante un estudio prospectivo e independiente. Para ello está en marcha el estudio de confirmación PARSC (*Prospective Study for the Assessment of Recurrence Risk in Stage II Colon Cancer Patients Using ColoPrint™* NCT00903565), que ha completado el reclutamiento y cuyos resultados se conocerán en un futuro próximo. En la Tabla 3 se resumen los estudios de validación de Oncotype Dx® y ColoPrint®

**Tabla 3. Estudios de validación de las firmas genéticas pronósticas OncotypeDx® y ColoPrint®.**

Validación	Oncotype DX®			ColoPrint®				
	QUASAR	CALGB 9581	NSABP07	Salazar	Maak	Kopetz		
Tamaño muestral	1436	162	892	206	135	416		
Grupos de riesgo:								
Bajo	43.7%	44%	39%	60%	74%	63%		
Medio	30.7%	33%	-	-	-	-		
Alto	25.6%	22%	26%	40%	26%	37%		
Evolución clínica por grupos de riesgo:	RR (3ª)	RR (5a)	RR (5a)		TLR (5a)	TLM (5a)	RR (5a)	
			E II	E III				
	Bajo	12%	12%	9%	21-40%	87.6%	94.9%	10%
	Medio	18%	15%	13%	29-51%	-	-	-
	Alto	22%	18%	18%	38-64%	67.2%	80.5%	21%
	p=0.04	p=0.013	p<0.001	p<0.001	p=0.01	p=0.009	p=0.004	
a: año; E: estadio; RR: riesgo de recurrencia; TLM; tiempo libre de metástasis a distancia; TLR: tiempo libre de recurrencia.								

### 2.3. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA

Los biomarcadores predictivos de respuesta permiten identificar a priori a aquellos pacientes que tienen mayor probabilidad de beneficiarse de un determinado tratamiento. El disponer de estas herramientas le evitaría al paciente la toxicidad, el gasto y el tiempo que conlleva recibir un tratamiento ineficaz, a la vez que le posibilitaría recibir una terapia alternativa con mayores posibilidades de éxito. Por otro lado, la identificación de marcadores biológicos predictivos de respuesta tumoral puede aportar información fundamental acerca de los mecanismos moleculares que determinan y regulan dicha respuesta, y facilitar el descubrimiento de vías de manipulación de la misma que permitan maximizar el efecto terapéutico. Actualmente, y como se ha descrito previamente, el estado mutacional KRAS y NRAS es el único biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento disponible en la práctica clínica para el manejo del CCRm.

Sin embargo, y a pesar de ser una necesidad no resuelta, la utilidad de los perfiles de expresión génica para predecir la respuesta tumoral a la quimioterapia ha sido escasamente investigada. La mayoría de los datos disponibles proviene de estudios preclínicos realizados en líneas celulares de CCR, donde se han obtenido varias firmas genéticas predictivas de respuesta a 5FU (Mariadason et al, 2003; Shimizu et al, 2005), irinotecan (Mariadason et al, 2003) y oxaliplatino (Arango et al, 2004).

Sólo dos estudios han propuesto firmas genéticas predictivas a partir de estudios realizados en muestras tumorales de pacientes con CCRm, aunque ambos cuentan con un limitado número de pacientes y los hallazgos no han sido validados en cohortes independientes de pacientes. Del Rio y colaboradores han identificado 14 genes predictivos de respuesta a FOLFIRI (5-fluoruracilo, leucovorin e irinotecan) en una pequeña serie de 21 pacientes (Del Rio et al, 2007), mientras que Watanabe *et al* han propuesto un modelo de 27 genes predictivo de respuesta a FOLFOX (5-fluoruracilo, leucovorin y oxaliplatino) en 40 pacientes (Watanabe et al, 2011).

Otro estudio reciente analizó el perfil de expresión génica de 1.290 tumores colorrectales, con el objetivo de identificar subtipos moleculares de CCR y correlacionarlos con la respuesta a cetuximab. Se determinaron seis subtipos de CCR, y se identificó que uno de ellos se asociaba a resistencia a cetuximab y sensibilidad a inhibidores de cMET, mientras que otros dos subtipos (inflamatorio, células madre) mostraban mayor sensibilidad al tratamiento con FOLFIRI (Sadanandam et al, 2013).

Se necesitan, por lo tanto, estudios con un mayor número de pacientes y su validación mediante estudios prospectivos e independientes antes de poder trasladar su uso a la práctica clínica.

# Hipótesis



# Hipótesis

---

El cáncer colorrectal metastásico (CCRm) es una enfermedad neoplásica molecularmente heterogénea y que comprende un espectro de tumores con una gran variabilidad en cuanto a su susceptibilidad a distintos fármacos antineoplásicos. Los perfiles de expresión génica difieren sustancialmente en tumores sensibles versus resistentes a determinados fármacos, y pueden por lo tanto ayudar a identificar prospectivamente aquellos tumores con mayor probabilidad de responder a una determinada terapia. La identificación de firmas genéticas predictivas de respuesta permitiría evitar al paciente la toxicidad, el gasto y el tiempo asociado a un determinado tratamiento, si a priori se puede predecir que no va a ser eficaz, a la vez que le posibilitaría recibir un tratamiento alternativo con mayores posibilidades de éxito. Por otro lado, la identificación de marcadores biológicos predictivos de respuesta tumoral puede aportar información fundamental acerca de los mecanismos moleculares que determinan y regulan dicha respuesta, y facilitar el descubrimiento de vías de manipulación de la misma que permitan maximizar el efecto terapéutico.





# Objetivos



# Objetivos

---

El objetivo global del proyecto es analizar el valor predictivo del perfil de expresión génica tumoral en pacientes con CCR avanzado irreseccable o metastásico tratados con quimioterapia convencional.

Con este fin se plantean los siguientes objetivos concretos:

1. Identificación de perfiles de expresión génica predictivos de respuesta terapéutica en una cohorte inicial de 40 pacientes con CCRm (cohorte de desarrollo) tratados con una combinación de quimioterapia estándar basada en fluoropirimidinas:

- Análisis en muestras tumorales frescas congeladas de los perfiles de expresión génica completa.
- Evaluación de la respuesta tumoral a la quimioterapia y de la supervivencia libre de progresión de los pacientes mediante criterios RECIST v1.0.
- Identificación de los patrones de expresión génica diferencial en tumores respondedores versus no respondedores al tratamiento con quimioterapia convencional recibido.

2. Validación mediante qRT-PCR en una cohorte independiente multicéntrica de 53 pacientes de la firma genética predictiva desarrollada.

3. Interpretación biológica de los genes seleccionados de interés

La consecución de estos objetivos permitirá, por un lado, el desarrollo de herramientas de utilidad clínica que harán posible una mejor selección de la terapia más adecuada para cada paciente y, por otro, avanzar en el conocimiento de los

mecanismos involucrados en la resistencia farmacológica, lo cual facilitará eventualmente el diseño de estrategias terapéuticas capaces de revertirla. Todo ello redundará, en definitiva, en mejorar el pronóstico de los pacientes con CCRm.

# **Material y Métodos**



# Material y métodos

---

## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Observacional, de cohorte, retrospectivo y multicéntrico.

## 2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Para la realización del estudio se establecieron 2 cohortes de pacientes:

1. Cohorte inicial de desarrollo. Incluye 40 muestras tumorales de pacientes con CCR avanzado procedentes del Hospital Marqués de Valdecilla de Santander.

2. Cohorte de validación. Formada por una cohorte multi-institucional independiente que incluye muestras tumorales de 53 pacientes diagnosticados de CCR avanzado. Las muestras de esta cohorte proceden de 4 Hospitales (Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, Hospital de la Merced de Osuna, Hospital Virgen de la Victoria de Málaga y Hospital Marqués de Valdecilla de Santander).

## 3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para la realización de este trabajo se emplearon muestras de tejido tumoral congelado en fresco procedentes de los pacientes mencionados diagnosticados de CCR avanzado. Los pacientes debían reunir las siguientes características para ser elegibles para el estudio: 1) Diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma colorrectal; 2) Estadio IV de la clasificación TNM (Edge et al, 2010); 3) Tratamiento

con al menos una línea de poliquimioterapia para enfermedad avanzada basada en fluoropirimidinas; 4) Enfermedad tumoral evaluable para respuesta según criterios RECIST v1.0 (Therasse et al, 2000); 5) Información clínica de calidad adecuadamente registrada en su historia clínica; 6) Muestra tumoral adecuadamente congelada en fresco a -80°C y con >50% de células tumorales (evaluado por patólogo) disponible en el Biobanco del hospital correspondiente; 7) Consentimiento informado firmado por el paciente.

#### **4. RECOGIDA DE INFORMACIÓN CLÍNICA Y CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El proyecto de investigación fue valorado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de los hospitales participantes de acuerdo a los procedimientos habituales de cada centro. Los pacientes firmaron el preceptivo consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio. Todo el proyecto se atuvo a los principios éticos universales recogidos en la declaración de Helsinki.

Las características clínico-patológicas de interés fueron obtenidas de la historia clínica del paciente y registradas en una base de datos que incluyó los siguientes parámetros: edad, sexo, raza, subtipo histológico, diferenciación tumoral, estadio TNM al diagnóstico, características moleculares del tumor (inestabilidad de microsatélites, mutaciones KRAS, NRAS y BRAF si disponibles), principales tratamientos médicos y quirúrgicos recibidos, y resultado terapéutico de los mismos. Las muestras de tejido fueron etiquetadas con las iniciales del paciente y un número específico manteniendo anónima su identidad e información personal en todo



momento. El análisis de las alteraciones moleculares se realizó por personal independiente que no disponía de acceso a la información personal del paciente correspondiente. El tratamiento de los datos de carácter personal se atuvo a la normativa vigente, el RD 223/2004 de 6 de Febrero y la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre sobre protección de datos de carácter personal. Finalmente se integraron en una base de datos conjunta la información molecular y clínica para establecer las correlaciones correspondientes de interés.

## **5. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRAS: EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACION DEL ARN, Y EVALUACION DE SU CALIDAD.**

El tejido congelado se pulverizó en presencia de nitrógeno líquido. A partir del tejido pulverizado se extrajo el ARN total empleando el kit *mirVana*<sup>™</sup> miRNA isolation kit de Ambion<sup>™</sup> siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

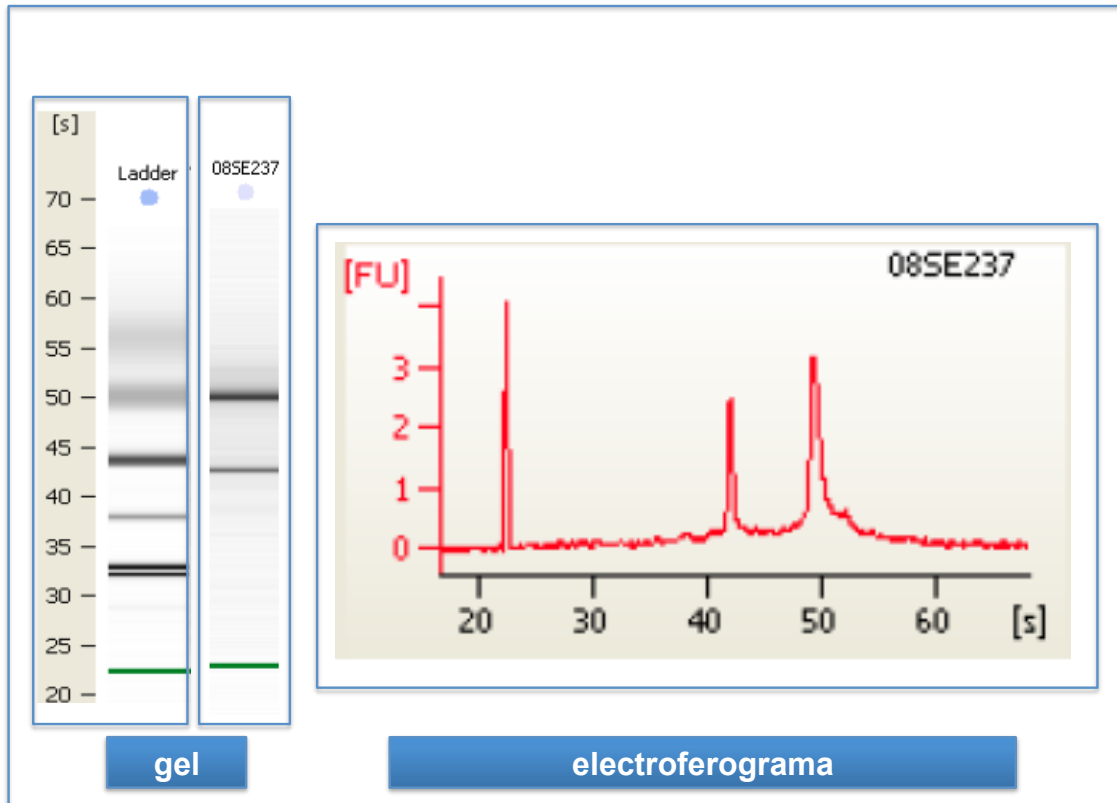
La cantidad y pureza del ARN obtenido se evaluó mediante la medición de la absorbancia con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). La concentración del ARN se midió en ng/ $\mu$ L, siendo la concentración mínima aceptada para la inclusión en el estudio 40 ng/ $\mu$ L.

Para comprobar la calidad del ARN, se empleó el método microfluídico de electroforesis del RNA 6000 Nano kit (Agilent® Technologies; Santa Clara, CA, USA), que permite un análisis altamente sensible y preciso con sólo 1  $\mu$ l de muestra. El análisis se realizó en el Bionalyzer 2100 de Agilent® que determina el perfil del ARN y establece un cociente entre los picos de ARN ribosomal de 18S y 28S. Se obtiene un índice denominado RIN (*RNA Integrity Number*), que cuantifica

la integridad y calidad de la muestra de forma objetiva. Para este estudio, consideramos adecuadas las muestras con RIN  $\geq 7$ . En la Tabla 4 se detallan los valores obtenidos en cada una de las muestras, resaltando en rojo tres que no alcanzaron el estándar de calidad y fueron excluidas del estudio. En la Figura 4 se muestra un ejemplo del análisis de una alícuota en el Bioanalyzer 2100 que confirma la calidad del ARN.

**Tabla 4. Medida de la concentración y pureza del ARN de las muestras de CCRm en la cohorte inicial de desarrollo.**

<b>Código proyecto</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Pureza (A<sub>260/280</sub>)</b>	<b>RNA Integrity Number (RIN)</b>
08SE197	1036	2.09	≥7
08SE199	721	2.08	≥7
08SE201	1	1.06	-
08SE203	11810	2.1	≥7
08SE205	614	2.08	≥7
08SE207	11	1.96	-
08SE209	521	2.09	≥7
08SE211	1799	2.08	≥7
08SE213	369	2.04	≥7
08SE215	587	2.07	≥7
08SE217	320	2.05	≥7
08SE219	2178	2.07	≥7
08SE221	724	2.09	≥7
08SE223	553	2.09	≥7
08SE225	1134	2.09	≥7
08SE227	11	1.95	-
08SE229	542	2.11	≥7
08SE231	145	2.03	≥7
08SE233	193	2.04	≥7
08SE235	3033	2.03	≥7
08SE237	43	2.01	≥7
08SE239	1156	2.09	≥7
08SE240	87	2.04	≥7
08SE242	1740	2.09	≥7
08SE244	920	2.09	≥7
08SE246	470	2.03	≥7
08SE247	367	2.05	≥7
08SE249	1797	2.09	≥7
08SE251	520	2.1	≥7
08SE253	447	2.04	≥7
08SE255	403	2.03	≥7
08SE257	1467	2.11	≥7
08SE259	371	2.05	≥7
08SE261	1080	2.1	≥7
08SE263	1503	2.1	≥7
08SE265	743	2.1	≥7
08SE267	269	2.04	≥7
08SE269	1210	2.1	≥7
08SE270	523	2.09	≥7
08SE272	587	2.11	≥7



**Figura 4. Ejemplo de electroferograma de ARN en la muestra 08SE237. Se observan los picos de ARN ribosomal 18S y 28S.**

## **6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA TUMORAL MEDIANTE MICROARRAYS DE OLIGONUCLEOTIDOS (COHORTE DE DESARROLLO)**

Los experimentos con microarrays se llevaron a cabo en colaboración con la empresa Progenika Biopharma S.A. (Bilbao, España).

## 6.1. SÍNTESIS DE ARN COMPLEMENTARIO BIOTINILADO

Dos  $\mu\text{g}$  del ARN total obtenido de cada una de las muestras se retrotranscribieron a su ADN complementario (ADNc) empleando el *One-Cycle cDNA Synthesis kit* de Affymetrix (Affymetrix Inc), siguiendo el protocolo recomendado por el Manual *Expression Analysis Technical* de la casa comercial. A partir de este *cDNA* se obtuvo ARN complementario (ARNc) según las indicaciones del *IVT Labeling kit* de Affymetrix. El ARNc sintetizado se purificó con el *GeneChip Sample Cleanup Module* de Affymetrix y se recuperó en un volumen de 22  $\mu\text{l}$  de agua. En la Tabla 5 se detallan los valores de concentración ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) y pureza de los ARNc obtenidos tras la purificación. Una vez sintetizado y purificado, el ARNc se fragmentó empleando 15  $\mu\text{g}$  de cada caso para preparar las muestras de hibridación.

**Tabla 5. Medida de la concentración y pureza de los ARNc tras la purificación.**

<b>Código proyecto</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Pureza (A<sub>260/280</sub>)</b>	<b>μg totales</b>
08SE197	2554	2.07	49.07
08SE199	1935	2.07	38.64
08SE203	2895	2.08	58.80
08SE205	2751	2.07	50.27
08SE209	2265	2.05	45.57
08SE211	2977	2.07	60.53
08SE213	3233	2.07	59.43
08SE215	2264	2.08	45.54
08SE217	2401	2.08	48.42
08SE219	43.02	2.03	71.14
08SE221	1559	2.06	30.74
08SE223	2463	2.09	42.34
08SE225	2831	2.07	54.62
08SE229	2518	2.07	45.84
08SE231	1139	2.06	19.63
08SE233	1933	2.08	36.66
08SE235	3761	2.08	76.98
08SE237	677	2.04	11.53
08SE239	2463	2.05	47.26
08SE240	1702	2.07	33.74
08SE242	2864	2.06	55.29
08SE244	1744	2.08	32.89
08SE246	3488	2.08	64.27
08SE247	4219	2.06	82.38
08SE249	3541	2.03	65.29
08SE251	2705	2.06	49.40
08SE253	1426	2.08	25.09
08SE255	1805	2.08	34.10
08SE257	1033	2.07	18.66
08SE259	1410	2.05	26.20
08SE261	1896	2.07	35.92
08SE263	1943	2.08	32.98
08SE265	1697	2.06	30.24
08SE267	2409	2.07	41.36
08SE269	3833	2.06	30.24
08SE270	2269	2.07	41.12
08SE272	1433	2.07	25.23

## **6.2. HIBRIDACIÓN DEL MICROARRAY**

La plataforma de microarrays utilizada en el estudio fue Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix), el cual interroga 54675 secuencias de oligonucleótidos.

El ARNc se fragmentó empleando 5x buffer 200 mMTris-acetato (pH 8,1)+500 mMKOAc+150 mM MgOAc. De cada ARNc, se tomaron 15 μg y se

añadieron a 200 µl de solución de hibridación (1x Mes buffer [0.1 M Mes + 1.0 M NaCl+ 20 mM ETA+ 0.01% Tween 20] y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque, 10% DMSO, 0.5 mg/ml BSA 50 pM oligonucleótido de control B2 y controles eucariotas de hibridación 1x (BioB, BioC, BioD, Cre). A continuación se añadió la mezcla de hibridación a los microarrays, y se incubaron en un horno de hibridación a 45°C durante 16 horas a 60 rpm.

Pasado este tiempo, los arrays se lavaron secuencialmente en las distintas soluciones tampón, y se aplicaron tinciones para intensificar la señal:

- 10 ciclos de lavado en una estación fluidica (FS400 Affymetrix) con 6x SSPE-T (0.9 M NaCl + 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 6 mM EDTA + 0.01% Tween 20) a 30°C.
- 6 ciclos de lavado con 0.1M Mes+0.1M NaCl+0.01% Tween 20 a 50°C.
- Tinción de los microarrays con conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes), seguido de 10 ciclos de lavado con 6x SSPE-T. Para intensificar la señal, los arrays se tiñeron nuevamente con anticuerpo anti-estreptavidina durante 5 minutos seguido de una nueva tinción de 5 minutos con conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, seguido de 15 ciclos de lavado.

### **6.3 ESCANEADO DEL MICROARRAY Y ANÁLISIS DE LA IMAGEN**

Para el análisis de las muestras hibridadas sobre los microarrays se utilizó el escáner láser confocal GC3000 (Affymetrix). La calidad de la hibridación se valoró inicialmente mediante inspección visual (una muestra válida debe mostrar fondos oscuros y señales de hibridación brillantes), y posteriormente se confirmó mediante dos parámetros:

- Presencia de los controles de calidad (*spike controls*). Los controles de calidad son sondas control para secuencias que se incluyen en la mezcla de hibridación, y su presencia indica que los procesos de hibridación, lavados, revelado y escaneado han sido correctamente realizados. Se han empleado BioB, BioC, BioD y Cre. El control menos representado en la muestra fue BioB, por lo que fue el empleado para valorar la sensibilidad del experimento.

- Relación 3'/5' de los genes controles endógenos (*housekeeping controls*). Los controles endógenos son sondas para genes expresados constitutivamente en todos los tipos celulares y cuya concentración celular debe permanecer constante en cualquier condición, lo cual es difícil que suceda en la realidad. Por ello, se aceptan como endógenos aquellos genes presentes en todas las células con expresión relativamente constante, y se emplearán genes distintos en función del tipo de experimento, de tejido, etc. En este estudio el gen endógeno elegido fue GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). En el array había sondas correspondientes a las zonas 3', central y 5' de este gen. La relación entre las señales de hibridación para las sondas 3' respecto de la 5' indica la integridad de los cRNAs sintetizados, siendo un reflejo de la calidad del ARN original utilizado para la síntesis. Así, una relación 3'/5' entre las señales de hibridación cercana a 1 indica integridad total del ARN y ARNc sintetizado. Debido a la potencial variabilidad dependiente tanto de la muestra como de las condiciones experimentales y, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Affymetrix), consideramos satisfactorios los experimentos cuya relación 3'/5' no superó el valor de 3.

Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarray se empleó GeneChip Operating



Software (GCOS 1.4, Affymetrix). GCOS permite depurar la imagen de imperfecciones y señales no deseadas, mide la fluorescencia de los arrays y establece si es posible la comparación fiable entre las muestras mediante la determinación del factor de escalado. Se calcula la intensidad media de todo el array promediando los valores de intensidad de todos los set de sondas a excepción del 2% de los valores con mayor y menor intensidad. Esa intensidad media es multiplicada por un valor arbitrario predefinido (en este caso 100), para obtener el factor de escalado. El factor de escalado de los distintos arrays de un mismo experimento deber estar próximo entre sí (sin que el valor de un array supere en ningún caso 3 veces el valor de cualquiera de los otros) y lo más cercano a 1 posible. El valor máximo permitido se estableció en 3.

Para el análisis estadístico se empleó el software Partek Genomics Suite v7.3.1 (Partek Inc.; St Louis, MO, USA), y se siguieron los pasos descritos a continuación:

1. Control de calidad de los arrays. La calidad de los arrays se evaluó mediante los siguientes parámetros:
  - a. *P call %*: indica el porcentaje de muestras detectadas como presentes en un array, y sirve para evaluar la calidad de la muestra.
  - b. *Array outlier*: Indica el porcentaje de muestras cuyos niveles en un array son inconsistentes con los niveles en el resto de arrays del experimento. Se empleó el programa de análisis dChip ([www.dchip.com](http://www.dchip.com)), que recomienda eliminar los valores de intensidad que superen el 15% y tomar con precaución los que superen el 5%.
  - c. *Normalized Unscaled Standard Error (NUSE)*: Se utilizó el paquete de BioConductor “affyPLM” para obtener valores de error estándar no

escalados normalizados (valores NUSE) para cada set de sondas a partir de los valores de intensidad de cada sonda, que debían encuadrarse en el rango considerado normal para continuar el análisis.

2. Normalización global de los arrays para la obtención de una lista de trabajo. Los valores de intensidad de cada sonda fueron procesados y normalizados mediante el método RMA (*Robust Multichip Average*) para obtener un valor de intensidad individual para cada set de sondas. Posteriormente, los datos fueron filtrados para eliminar las secuencias control, las secuencias con señal de hibridación cercana al fondo (*background*) y aquellas secuencias que no presentaban cambios de expresión en ninguna de las muestras basándose en la desviación estándar de los datos de intensidad normalizados.

#### **6.4 APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA IDENTIFICAR PERFILES DIFERENCIALES DE EXPRESIÓN GÉNICA**

Se empleó el análisis de componentes principales (PCA) y el clúster jerárquico como métodos para estudiar las diferencias en la expresión génica entre los distintos grupos de interés. El PCA es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión de los datos (en este caso, los valores de expresión de cada sonda). El objetivo del PCA es la representación de las medidas numéricas de las sondas en un espacio de pocas dimensiones donde se puedan percibir relaciones que de otra forma permanecerían ocultas. Es decir, ante el gran volumen de datos que supone cada uno de los valores de expresión de cada gen, el objetivo es reducirlos al menor número posible perdiendo la menor cantidad de información posible. La elección de los componentes se

realiza de forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original presente en el experimento, el segundo factor recoja la máxima variabilidad posible no recogida en el primero, y así sucesivamente. El número de componentes principales que se emplea por defecto es 3 y con ello se puede explicar un porcentaje de la varianza existente de forma gráfica. La imagen resultante se compara con las condiciones experimentales especificadas para poder estudiar si existe relación entre la variabilidad observada (es decir, las diferencias de expresión) y estas condiciones. El clúster o árbol jerárquico es un método estadístico que permite la clasificación de los perfiles de expresión de los genes en grupos o clústers por similitud entre ellos. Se calcula la distancia de cada muestra con todas las demás y se agrupan las dos que muestren una correlación más alta. A continuación se calcula la media del perfil de expresión de esas dos y con este dato sintético se repite el cálculo de la distancia con todas las demás. Este proceso se repite hasta que todas las muestras han sido agrupadas por parejas. Posteriormente, se calculan los ratios de separación y la medida de similitud que organizarán el árbol formando grupos discretos y ramificaciones, respectivamente. Se empleó el *average linkage* como método de agrupación y como medida de similitud la distancia euclídea. La elaboración de este clúster y PCA no supervisados (los genes no son el resultado de la aplicación de un test estadístico) permite ver de forma aproximada las diferencias existentes entre cada una de las condiciones así como la variabilidad dentro de cada condición.

Para la identificación de cambios en la expresión entre los grupos de muestras se realizó un modelo de regresión lineal

$$[1] Y_i = \text{Respuesta} + \varepsilon$$

donde  $Y_i$  es la intensidad  $Y$  para cada secuencia  $i$ ; Respuesta se refiere al efecto de la condición en la intensidad observada y  $\varepsilon$  es el error no medible que reúne la parte no predicha del resto de variables. De esta forma se pueden obtener las secuencias diferencialmente expresadas en los grupos estudiados.

Se consideraron estadísticamente significativos los genes para los que el *p-value* era menor de 0.05, aplicando el test de corrección múltiple de Bonferroni (Gordon et al, 2007) para disminuir el número de falsos positivos.

Las tablas con los datos crudos de los microarrays se depositaron en la base GEO (*National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus*) con el código de acceso GSE52735.

## **7. VALIDACIÓN DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA**

La validación de los genes diferencialmente expresados en los microarrays se realizó determinando la expresión de cada gen mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Esta técnica emplea un termociclador que incluye un detector para medir la intensidad de fluorescencia emitida por las sondas, de tal forma que los productos originados durante la reacción de amplificación son detectados y monitorizados a la vez que se generan.

Entre las aplicaciones de la PCR cuantitativa destaca su utilidad para realizar ensayos de expresión. Estos ensayos están basados en la determinación del *cycle threshold (Ct)* o ciclo umbral, que es el ciclo a partir del cual la fluorescencia emitida

por el gen diana sobrepasa el umbral de ruido. Se calcula en escala logarítmica. A mayor cantidad de ADN inicial, menor  $C_t$ , ya que la cantidad de ADN amplificado capaz de ser detectada por el aparato se producirá antes.

En este estudio se realizó una cuantificación relativa del ADN, en la que la expresión de cada gen diana a estudio se analizaba en relación a la expresión de un gen control endógeno de referencia. El gen endógeno elegido de nuevo fue GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

### **7.1 CONDICIONES DE LA qRT-PCR**

Empleamos las tarjetas microfluídicas de arrays de baja intensidad Taqman (*Taqman Low Density Arrays TLDA*, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Se extrajo ARN total mediante *mirVana*<sup>™</sup> miRNA isolation kit de Ambion<sup>™</sup> siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ARN se evaluó tanto cuantitativa como cualitativamente según lo descrito en el apartado 5 “*Cuantificación del ARN y medida de la calidad*”.

Las TLDA se realizaron en dos pasos. En primer lugar se retrotranscribieron 800 ng (50 ng/16 $\mu$ L) de ARN total empleando Megaplex RT Primers y el TAqManRNA reverse transcription kit en un volumen total de 20  $\mu$ L. Esta reacción se realizó en el termociclador GStorm Thermal Cycler (Gene Technologies, Essex, UK) y las condiciones de retrotranscripción consistieron en 40 ciclos a 25°C durante 5 minutos, 42°C durante 30 minutos y 50°C durante 1 minuto y un último paso de un ciclo de 85°C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 450  $\mu$ L de cDNA de cada muestra a 450  $\mu$ L de TaqMan Universal PCR Master Mix, y se dispensaron en los diferentes puertos de la tarjeta microfluídica TLDA. La tarjeta se centrifugó a 280g durante 1 minuto para distribuir la muestra en los múltiples pocillos conectados

al puerto, y después se selló para evitar contaminación entre los pocillos. Para el análisis mediante fluorescencia con sondas TaqMan se empleó el software ABIPRISM® 7900HT Sequence Detection System (SDS 2.3, Applied Biosystems). La reacción se realizó durante 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

## 7.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA qRT-PCR

Se estableció un umbral basal de 0,2 para la determinación de los valores de ciclo umbral ( $C_t$ ) para cada gen analizado, utilizando para ello el software SDS v.2.3 (Applied Biosystems). Los cálculos se realizaron empleando el método de comparación del  $2^{-\Delta C_t}$ ,

donde  $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t$  de la muestra a estudio –  $\Delta C_t$  de la muestra control

siendo  $\Delta C_t = (C_t \text{ gen diana} - C_t \text{ gen endógeno})$

En nuestro estudio, por tanto, la cuantificación normalizada mediante  $2^{-\Delta C_t}$ , siendo  $\Delta C_t = (C_t \text{ gen diana} - C_t \text{ control endógeno GAPDH})$ , proporcionó la información sobre la cantidad de expresión de los genes dianas en valor relativo. Asimismo identificamos cuánto se expresaba un gen con respecto al tipo de respuesta mediante  $2^{-\Delta \Delta C_t}$ , siendo  $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t$  de los respondedores (R) –  $\Delta C_t$  de los no respondedores (NR).

Posteriormente se empleó el software *Real-Time Statminer*® v.4.2 (Intergromics, Inc), que realiza un test de Student entre los grupos de comparación (R y NR) y lo corrige utilizando el algoritmo de Benjamini-Hochberg (Benjamini, 1995) que acepta un porcentaje de falsos positivos (*false discovery rate [FDR]*) del 5%. Para nuestro estudio, se consideró la expresión génica valorable cuando el gen

se había detectado en al menos el 40% de los pacientes en cada grupo de comparación.

Las tablas con los datos completos del análisis se depositaron en la base GEO (*National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus*) con el código de acceso GSE52513.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS**

Se emplearon estadísticos descriptivos para caracterizar los parámetros de los pacientes y de las muestras más relevantes. Los estudios de correlación entre variables cuantitativas se realizaron con el test de Spearman y para las variables cualitativas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher. La evaluación de la distribución de variables cuantitativas entre los grupos a estudio se realizó mediante test paramétricos (t de Student) o no paramétricos (Kruskal-Wallis o Mann-Whitney) según lo requerido para cada variable.

La evaluación de la respuesta tumoral se realizó de acuerdo a los criterios RECIST v1.0 (Therasse et al, 2000): Respuesta completa (RC) se define como la desaparición de todas las lesiones medibles y evaluables; Respuesta parcial (RP) como la reducción  $\geq 30\%$  de la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana; Enfermedad estable (EE) se define como una reducción menor del 30% o un crecimiento menor del 20%; y la Progresión de la enfermedad (PE) se considera si existe un crecimiento  $>20\%$  de la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana o hay aparición de alguna lesión nueva.

Los pacientes se clasificaron en función de estos criterios en dos grupos, de acuerdo con la mejor respuesta tumoral alcanzada: 1) Pacientes respondedores [R]: aquellos que alcanzaron una respuesta tumoral objetiva (RC ó RP) y 2) Pacientes no respondedores [NR]: los que no la alcanzaron (EE ó PE).

La supervivencia libre de progresión (SLP) se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento con QT de primera línea para enfermedad metastásica hasta la fecha de documentación de la progresión de la enfermedad (o fecha de último contacto en pacientes que no habían progresado). La supervivencia global (SG) se calculó desde el inicio de la quimioterapia de primera línea para enfermedad metastásica hasta la fecha de la muerte por cualquier causa (o la fecha de último contacto en pacientes que no habían fallecido).

Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier, y las diferencias en supervivencia entre ambos grupos fueron evaluadas mediante el test log-rank. La significación estadística se estableció en  $p < 0.05$ .

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 16.0 en entorno Windows®.

## **9. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES DE INTERÉS**

Una vez identificados los genes diferencialmente expresados, se identificaron las rutas metabólicas y ontologías enriquecidas diferencialmente empleando software especializado. Se consultaron las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), donde se indica el nombre del gen, localización cromosómica, función biológica, localización celular de la



proteína y ruta molecular a la que pertenece. Se empleó la clasificación *Gene Ontology* (Ashburner et al, 2000) ([www.geneontology.com](http://www.geneontology.com)) para identificar términos GO correspondientes a los genes de interés identificados. Estos términos permiten clasificar jerárquicamente las características de los genes. Cada término GO presenta un identificador numérico único, y se asigna a una de las tres categorías ontológicas: función molecular, componente celular o proceso biológico. Esta herramienta nos permitió identificar grupos de genes relacionados entre sí dentro de la lista de genes obtenida, asociarlos con distintas enfermedades, visualizar las rutas metabólicas en las que intervienen los genes seleccionados e investigar las proteínas codificadas por dichos genes y las posibles interacciones entre ellas.



# Resultados



# Resultados

---

## **1. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

### **1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES**

La población de estudio ha incluido un total de 90 pacientes divididos en 2 cohortes: 1) Una cohorte inicial de desarrollo que incluyó 40 pacientes, de los cuales 37 fueron elegibles por presentar muestra de ARN válida para el análisis de microarrays y cumplir con el resto de criterios de inclusión requeridos, y 2) Una cohorte de validación independiente que incluyó 53 pacientes.

Los pacientes del estudio eran representativos de una población estándar de CCRm. Las características clínicas y demográficas más relevantes de los pacientes, así como el tratamiento oncológico recibido se detalla en la Tabla 6., No se observaron diferencias significativas en la distribución de las variables principales entre las dos cohortes del estudio. La mediana de edad fue de 61 años en la cohorte inicial y de 65 años en la de validación, con una proporción discretamente mayor de varones que de mujeres en ambas cohortes (57 y 66%, respectivamente). Por ser criterio de inclusión en el estudio, todos los pacientes presentaban enfermedad metastásica en el momento de su inclusión, habían recibido QT estándar de primera línea y eran evaluables para respuesta. Aproximadamente el 80% de los pacientes habían debutado con enfermedad metastásica al diagnóstico, y casi el 100% de los pacientes presentaban buen estado funcional (*Performance Status* 0-1). Los parámetros de laboratorio fueron algo más desfavorables en la cohorte inicial que en la de validación, aunque únicamente se observaron diferencias significativas en

relación a la LDH (más elevada en la cohorte inicial). Todos los pacientes recibieron esquemas de QT basados en fluoropirimidinas. En la cohorte de desarrollo todos los pacientes recibieron esquemas de poliquimioterapia basados en fluoropirimidinas y oxaliplatino (87% dobletes, 13% tripletes), y en la cohorte de validación el 72% fue tratado con combinaciones de fluoropirimidinas y oxaliplatino, y el 23% con combinaciones de fluoropirimidinas e irinotecan. La tasa global de respuesta al tratamiento, que incluye la suma de las respuestas parciales y las respuestas completas, fue del 62% en la cohorte inicial y del 51% en la cohorte de validación.

La gran mayoría de los pacientes habían experimentado progresión tumoral tras la primera línea de QT en el momento del análisis en ambas cohortes (un 95% de los pacientes en la cohorte inicial y un 76% en la de validación). El análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) mostró datos similares en ambas cohortes, con una mediana de SLP en la cohorte inicial de 11.13 meses y de 11.53 meses en la cohorte de validación.

La mediana de seguimiento de los pacientes vivos fue de 34.3 meses en la cohorte inicial y de 30.5 meses en la de validación. Al igual que con la SLP, el análisis de supervivencia global (SG) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las dos cohortes, con medianas de SG de 22.9 meses en la cohorte inicial y de 26.73 meses en la de validación.

**Tabla 6. Características clínicas de la población de estudio y tratamiento recibido.**

Características	Cohorte inicial (n=37) N (%)	Cohorte de validación (n=53) N (%)	P
Edad (años)			
• Mediana (rango)	61 (47-79)	65 (42-80)	0.192
Sexo			
• Mujer	16 (43.0)	18 (34.0)	0.387
• Hombre	21 (57.0)	35 (66.0)	
Enfermedad metastásica al diagnóstico			
• Sí	32 (86.5)	41 (77.4)	0.412
• No	5 (13.5)	12 (22.6)	
Performance status			
• 0-1	37 (100)	49 (92.5)	0.140
• 2	0 (0)	4 (7.5)	
Parámetros de laboratorio (mediana [rango])			
• CEA (ng/ml)	65 (1-4007)	15 (1-14948)	0.407
• Hemoglobina (g/dl)	12 (2-15)	12 (8-15)	0.459
• Fosfatasa alcalina (UI/L)	107 (48-620)	88 (43-1618)	0.777
• Lactato deshidrogenasa (UI/L)	461 (273-2692)	258 (109-1095)	0.001
Esquemas de QT en 1ª línea			
• Esquemas basados en oxaliplatino	32 (86.5)	38 (71.7)	<0.001
• Esquemas basados en irinotecan	0 (0.0)	12 (22.6)	
• Triplete (oxaliplatino + irinotecan + FP)	5 (13.5)	0 (0.0)	
• FP en monoterapia	0 (0.0)	3 (5.7)	
Mejor respuesta del tumor a 1ª línea QT			
• RC	1 (2.7)	7 (13.2)	0.117
• RP	22 (59.5)	20 (37.7)	
• EE	11 (29.7)	18 (34.0)	
• PE	3 (8.1)	8 (15.1)	
Progresión tumoral tras 1ª línea QT			
• Sí	35 (94.5)	40 (75.5)	0.346
• No	2 (5.5)	13 (24.5)	
Resección quirúrgica de metástasis			
• Sí	9 (24.4)	13 (24.5)	1.000
• No	28 (75.6)	40 (75.5)	
Seguimiento de pacientes vivos (meses)			
• Mediana (rango)	34.3 (15.9-77-57)	30.5 (7-77.6)	0.456
Situación del paciente en el último contacto			
• Fallecido	15 (40.5)	25 (47.2)	0.187
• Vivo con enfermedad	21 (56.8)	22 (41.5)	
• Vivo sin enfermedad	1 (2.7)	6 (11.3)	

CEA: *Carcinoembryonic antigen* (Antígeno carcinoembrionario); FP: fluoropirimidinas; RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; PE: progresión de la enfermedad.

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES

En la Tabla 7 se detallan las características tumorales de la población de estudio. No se apreciaron diferencias significativas en la distribución entre ambas cohortes de la mayoría de estas características. Las muestras de tumor procedieron de piezas quirúrgicas en la práctica totalidad de los pacientes. El 70% de los tumores se localizaban en el colon y el 30% en el recto. En todas las muestras se confirmó el diagnóstico histológico de carcinoma colorrectal, siendo el subtipo histológico de adenocarcinoma en el 100% de los casos de la cohorte inicial y en el 93% de los casos en la cohorte de validación, que también incluyó 4 casos de carcinoma mucinoso (7.5%). El estado mutacional de K-RAS se determinó en todas las muestras, encontrando el genotipo no mutado en un 46% de los pacientes de la cohorte inicial y en un 49% de los de la cohorte de validación. En la cohorte inicial hubo una mayor incidencia de tumores pobremente diferenciados y con invasión linfovascular, y una mayor proporción de pacientes con metástasis hepáticas (Tabla 7).



**Tabla 7. Características tumorales de la población de estudio.**

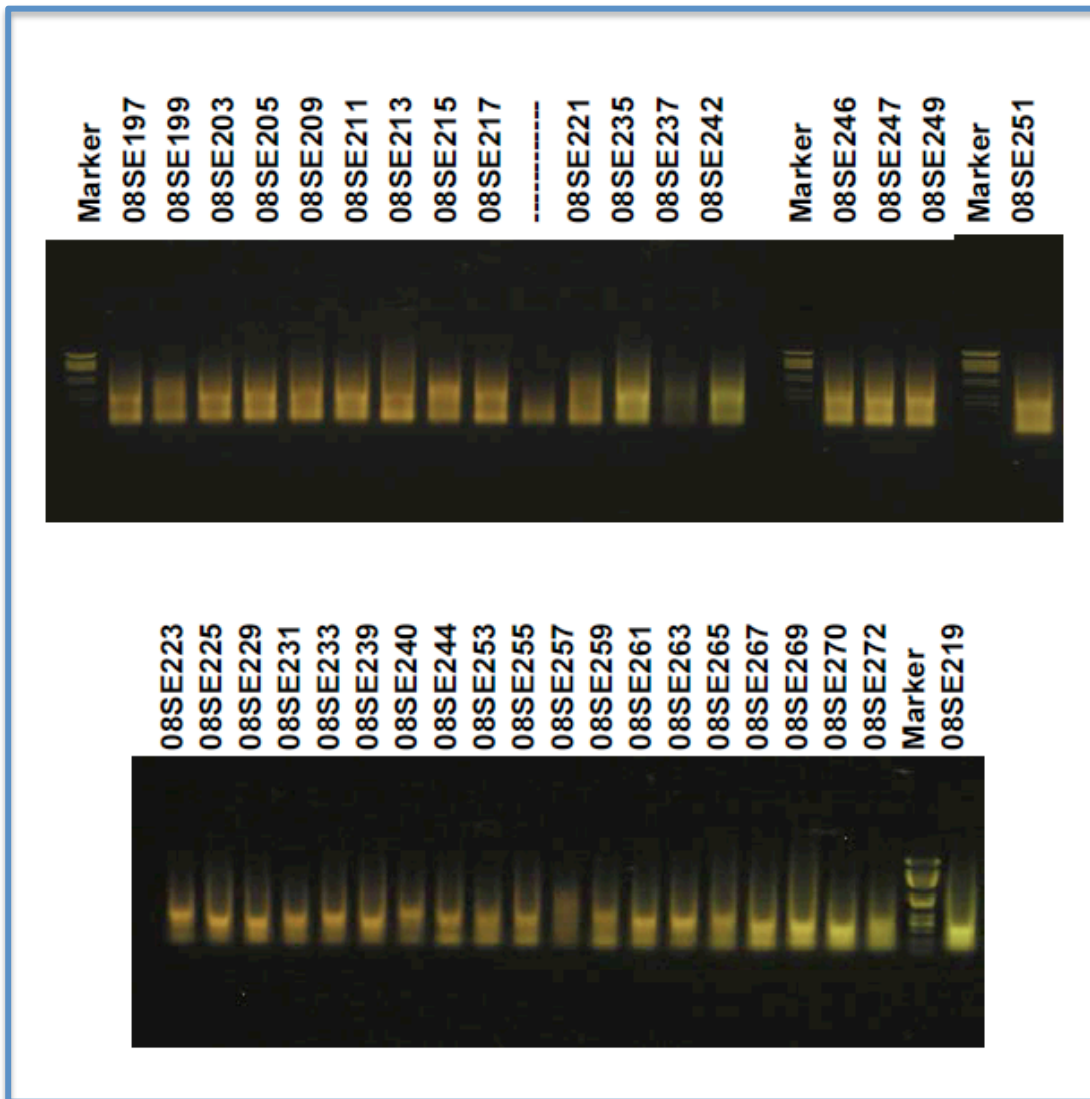
Características	Cohorte inicial (n=37) N (%)	Cohorte de validación (n=53) N (%)	P
<b>Tipo de muestra</b>			
• Pieza quirúrgica	35 (94.6)	53 (100.0)	0.231
• Biopsia endoscópica	1 (2.7)	0 (0.0)	
• Otras	1 (2.7)	0 (0.0)	
<b>Localización del tumor</b>			
Localización del tumor primario			0.813
• Colon	26 (70.0)	39 (73.6)	
• Recto	11 (30.0)	14 (26.4)	
Localizaciones metastásicas			
• Hígado	30 (81.0)	29 (54.7)	0.013
• Pulmón	11 (30.0)	12 (22.6)	0.471
• Carcinomatosis peritoneal	6 (16.0)	11 (20.8)	0.785
• Otras	1 (2.7)	23 (43.4)	<0.001
<b>Características histopatológicas</b>			
Histología			
• Adenocarcinoma	37 (100)	49 (92.5)	0.140
• Carcinoma mucinoso	0 (0.0)	4 (7.5)	
Grado de diferenciación tumoral			
• Bien diferenciado	14 (37.8)	24 (45.3)	0.047
• Moderadamente diferenciado	8 (21.6)	20 (37.7)	
• Pobremente diferenciado	13 (35.1)	6 (11.3)	
• Desconocido	2 (5.4)	3 (5.7)	
Invasión linfovascular			
• Sí	23 (62.2)	9 (17.0)	<0.001
• No	3 (8.1)	12 (22.6)	
• Desconocida	14 (29.7)	32 (60.4)	
Estatus mutacional K-ras			
• No mutado ( <i>wild-type</i> )	17 (45.9)	26 (49.1)	0.393
• Mutado	20 (54.1)	27 (50.9)	

## 2. EVALUACIÓN DE LA SINTESIS Y PURIFICACIÓN DEL ARNc PREVIA A LA HIBRIDACIÓN EN EL MICROARRAY.

En primer lugar, las muestras tumorales congeladas se procesaron según el método descrito y se comprobó que la cantidad y calidad del ARN extraído

cumplieran los requisitos necesarios (concentración  $>40$  ng/  $\mu$ L y RIN  $\geq 7$ ), lo que se confirmó en 37 de los 40 casos incluidos en la cohorte de desarrollo.

A continuación, a partir de una pequeña cantidad de ARN de cada muestra se realizó el proceso descrito en el apartado “Material y métodos” para sintetizar ADNc y el ARNc correspondiente. Se consiguió ARNc purificado con la concentración y pureza necesarias para continuar el experimento en las 37 muestras tumorales. En la Figura 5 se confirma mediante electroforesis en gel de agarosa la síntesis correcta de los ARNc purificados.



**Figura 5. Comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los ARNc purificados.**

El último paso del procesamiento de las muestras de ARNc consistió en la fragmentación del ARNc para preparar las mezclas de hibridación, comprobándose por electroforesis en gel de agarosa la correcta realización de la técnica en las 37 muestras estudiadas (Figura 6).

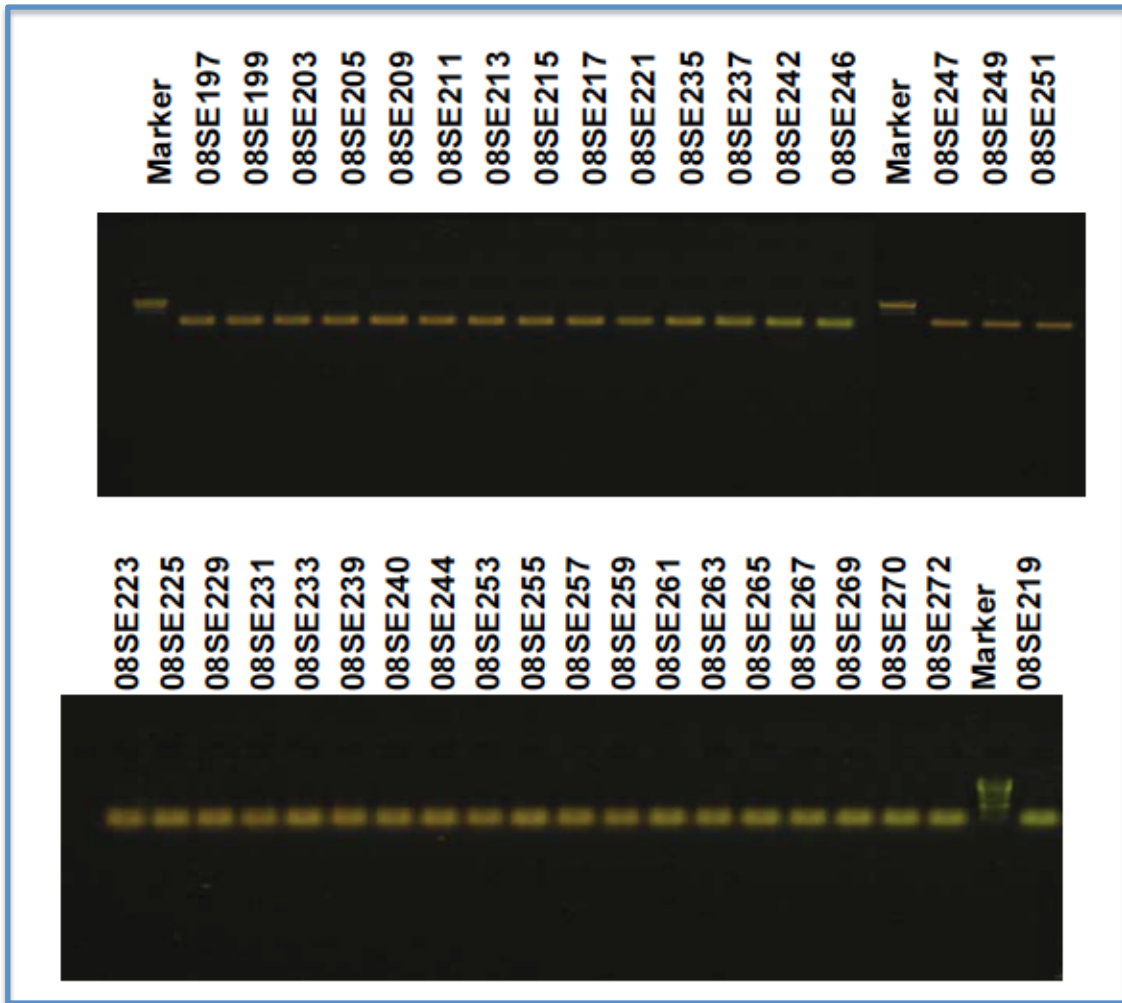


Figura 6. Comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los ARNc fragmentados.

### 3. GENERACIÓN DEL MICROARRAY. ANÁLISIS DE CALIDAD Y OBTENCIÓN DE LOS VALORES CUANTITATIVOS

El proceso de preparación de la mezcla de hibridación para la generación de los 37 microarrays se detalla en el apartado “Material y métodos”. Una vez hibridados y obtenidas las imágenes de fluorescencia de cada uno de ellos, se procedió al procesamiento y análisis de los datos. El primer paso consistió en la confirmación de la calidad de hibridación, que se realizó inicialmente mediante

inspección visual de los 37 microarrays, y posteriormente mediante el análisis de dos parámetros fundamentales: la presencia de controles de calidad (*spike controls*), y los genes de control endógenos (*housekeeping controls*). En este estudio, BioB fue el control de calidad elegido, y el gen GAPDH fue el seleccionado como control endógeno.

Tras evaluar las imágenes de cada uno de los arrays hibridados en el estudio y teniendo en cuenta los criterios de calidad (presencia de BioB en todos los microarrays y relación 3'/5' de GAPDH < 3), los 37 arrays hibridados superaron los criterios de calidad establecidos.

A continuación, se obtuvieron los valores cuantitativos de cada microarray tras emplear el software GCOS, que permite depurar la imagen de fluorescencia de artefactos y determina el factor de escalado para confirmar que la comparación entre las muestras es fiable. En este estudio, se llevó a cabo el escalado de los datos de cada array definiendo como la intensidad media el valor arbitrario de 100. Se preestableció como premisa que el factor de escalado de los microarrays fuese próximo entre ellos (sin que el factor de escalado de ningún array fuese superior a tres veces el de cualquiera de los otros) y cercano a 1. En este experimento, la máxima diferencia en los factores de escalado se objetivó entre las muestras 08SE221 (2.708) y 08SE247 (0.830), siendo 3.2 la diferencia entre los valores de ambas muestras. En el resto la diferencia no superó en ningún caso el valor recomendado de 3, lo que indica la posibilidad de hacer comparaciones entre las muestras de forma fiable. En la Tabla 8 se detallan los parámetros de calidad obtenidos para cada uno de los microarrays analizados.

**Tabla 8. Análisis de calidad de hibridación de los microarrays.**

<b>Código proyecto</b>	<b>Spike control BioB</b>	<b>GAPDH (3'/5')</b>	<b>Factor de escalado (TGT=100)</b>	<b>% presentes</b>
08SE197	Presente	1.18	0.970	41.7
08SE199	Presente	1.81	1.047	45.8
08SE203	Presente	1.59	1.081	44.1
08SE205	Presente	1.49	1.119	45.1
08SE209	Presente	1.42	1.103	44.2
08SE211	Presente	1.43	0.980	43.6
08SE213	Presente	1.50	1.225	44.1
08SE215	Presente	1.35	1.214	45.2
08SE217	Presente	1.32	0.994	45.4
08SE219	Presente	1.39	1.137	41.0
08SE221	Presente	2.39	2.708	38.4
08SE223	Presente	1.26	1.248	41.8
08SE225	Presente	1.21	0.888	45.7
08SE229	Presente	1.38	1.118	44.6
08SE231	Presente	1.68	1.304	42.7
08SE233	Presente	1.31	0.912	46.1
08SE235	Presente	1.63	1.059	41.1
08SE237	Presente	1.51	1.150	45.7
08SE239	Presente	1.51	1.166	44.1
08SE240	Presente	1.57	1.292	43.4
08SE242	Presente	1.58	1.323	42.2
08SE244	Presente	1.60	1.292	43.4
08SE246	Presente	1.24	1.009	44.9
08SE247	Presente	1.19	0.830	46.8
08SE249	Presente	1.20	1.008	46.1
08SE251	Presente	1.22	1.307	42.6
08SE253	Presente	2.43	2.336	40.1
08SE255	Presente	1.28	0.996	46.4
08SE257	Presente	3.62	2.322	36.8
08SE259	Presente	1.47	1.680	41.8
08SE261	Presente	1.76	1.972	38.4
08SE263	Presente	1.21	1.226	42.5
08SE265	Presente	1.98	1.879	40.4
08SE267	Presente	1.66	1.066	46.6
08SE269	Presente	1.92	1.051	42.1
08SE270	Presente	1.84	1.323	43.6
08SE272	Presente	2.36	1.566	46.7

## **4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

### **4.1. EVALUACION DE LA CALIDAD DE LOS DATOS DE LOS MICROARRAYS**

Para estudiar la calidad de los arrays se emplearon los parámetros *p call %*, *array outlier* y *NUSE* (valores de error estándar sin escala normalizados).

*P call %* indica el porcentaje de secuencias que se detectaron como presentes en cada array, y en este estudio, todas las muestras presentaron valores adecuados (Tabla 9). *Array outlier* analiza la consistencia entre los datos obtenidos en los distintos microarrays. Mediante el programa dChip se determinó el porcentaje de secuencias cuyos niveles eran inconsistentes con los hallados en el resto de arrays. De las 37 muestras, 35 presentaron una buena calidad de los cRNA y de los datos obtenidos, con valores de % de *array outlier* que indicaban una adecuada consistencia entre los mismos. Sólo las muestras 08SE235 y 08SE257 presentaron valores superiores al 5% (6.292 y 10.857, respectivamente), pero no superaron el límite fijado del 15% para considerar la eliminación de las muestras. Por tanto, en el subsecuente análisis se prestó especial atención a estas dos muestras para comprobar su comportamiento y confirmar su validez. Los parámetros mencionados relacionados con la calidad de los datos de los arrays se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9. Indicadores de la calidad de los datos de los arrays.**

<b>Código proyecto</b>	<b>% P call</b>	<b>% Array outlier</b>
08SE197	41.7	2.156
08SE199	45.8	0.388
08SE203	44.1	0.443
08SE205	45.1	0.108
08SE209	44.2	0.399
08SE211	43.6	0.668
08SE213	44.1	0.179
08SE215	45.2	1.094
08SE217	45.4	0.262
08SE219	41	0.951
08SE221	38.4	0.673
08SE223	41.8	1.992
08SE225	45.7	1.853
08SE229	44.6	0.701
08SE231	42.7	0.39
08SE233	46.1	0.207
08SE235	41.1	6.292
08SE237	45.7	2.314
08SE239	44.1	1.063
08SE240	43.4	2.879
08SE242	42.2	1.556
08SE244	42.4	0.463
08SE246	44.9	0.154
08SE247	46.8	1.275
08SE249	46.1	0.369
08SE251	42.6	1.427
08SE253	40.1	0.682
08SE255	46.4	2.884
08SE257	36.8	10.857
08SE259	41.8	0.532
08SE261	38.4	2.542
08SE263	42.5	0.494
08SE265	40.4	1.434
08SE267	46.6	1.728
08SE269	42.1	4.099
08SE270	43.6	1.289
08SE272	46.7	2.793

Los valores *NUSE* reflejan el error estándar sin escala normalizado para cada set de sondas a partir de los valores de intensidad de cada sonda en el set. En el estudio, todas las muestras presentaron unos valores *NUSE* dentro del rango adecuado. La mediana de estos valores, los percentiles 25 y 75, y los valores



exteriores o anómalos están representados mediante un diagrama de cajas en la Figura 7.

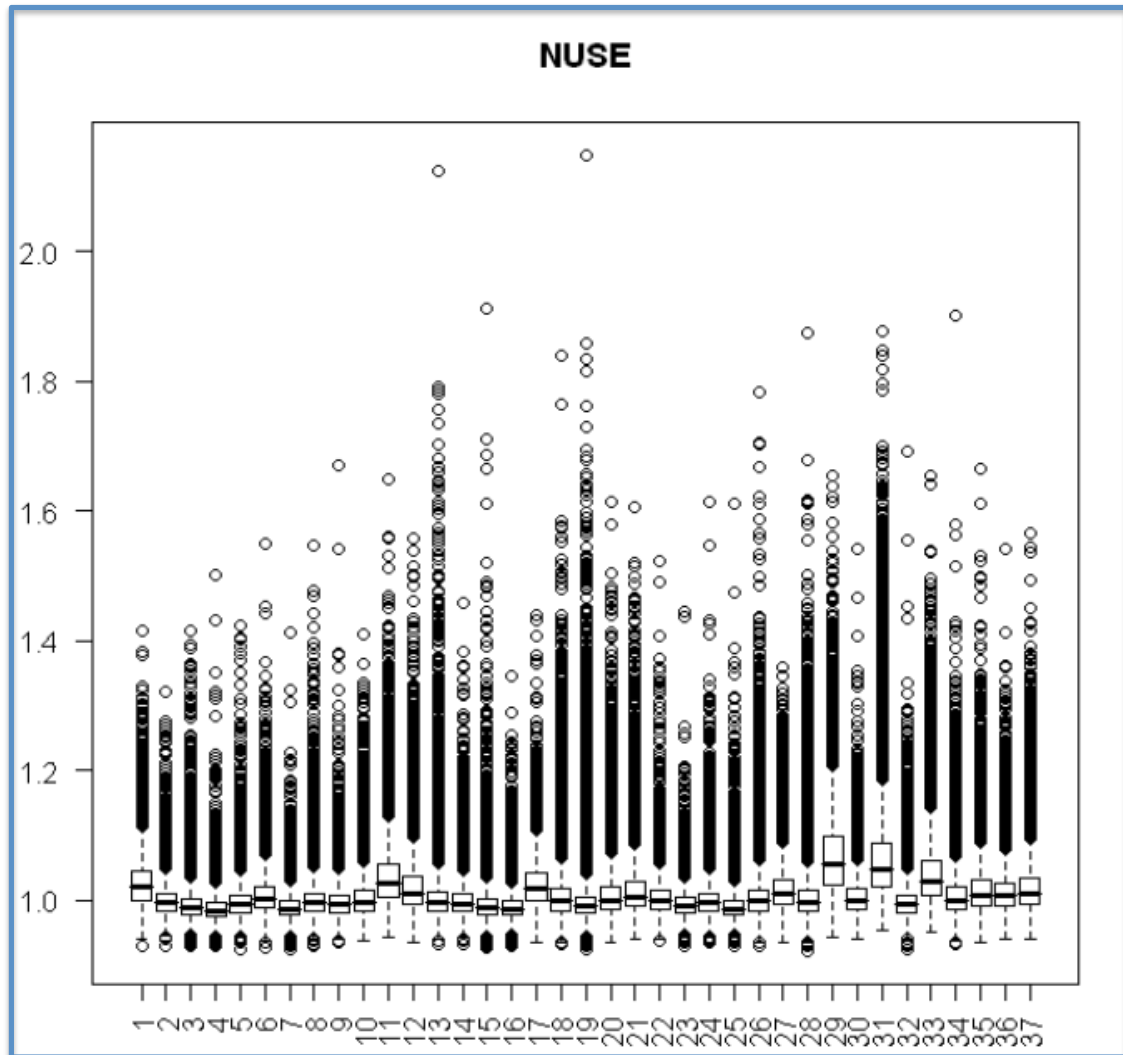


Figura 7. Gráfica NUSE representando el error estándar de cada sonda en cada uno de los arrays.

#### 4.2 NORMALIZACIÓN DE LOS DATOS

El proceso de normalización permite minimizar la variabilidad experimental (debida a las muestras) y sistemática (debida al procesado) que puede asociarse a un experimento de estas características. De esta forma es posible medir la

expresión génica de forma precisa y fiable, y comparar los niveles de expresión en el conjunto de los microarrays estudiados.

Tras procesar y normalizar los valores de intensidad de cada gen mediante el método RMA (*Robust Multichip Average*), se realizó un primer filtrado de los datos que eliminó las secuencias control y las secuencias con señal de hibridación cercana al fondo, obteniéndose los datos de 15902 genes. A continuación se llevó a cabo un paso de normalización por cuantiles (Bolstad et al, 2003)

En un segundo filtrado se eliminaron las sondas que no presentaban cambios de expresión en ninguna de las muestras, basándose en la desviación estándar de los datos de intensidad normalizados. El valor utilizado como límite de cambio de expresión entre condiciones permite eliminar secuencias que no varían en la comparación entre cualquiera de las muestras del experimento y por lo tanto no son informativas. Este filtrado dio lugar a un listado de 9.619 secuencias que constituyeron la lista definitiva de trabajo.

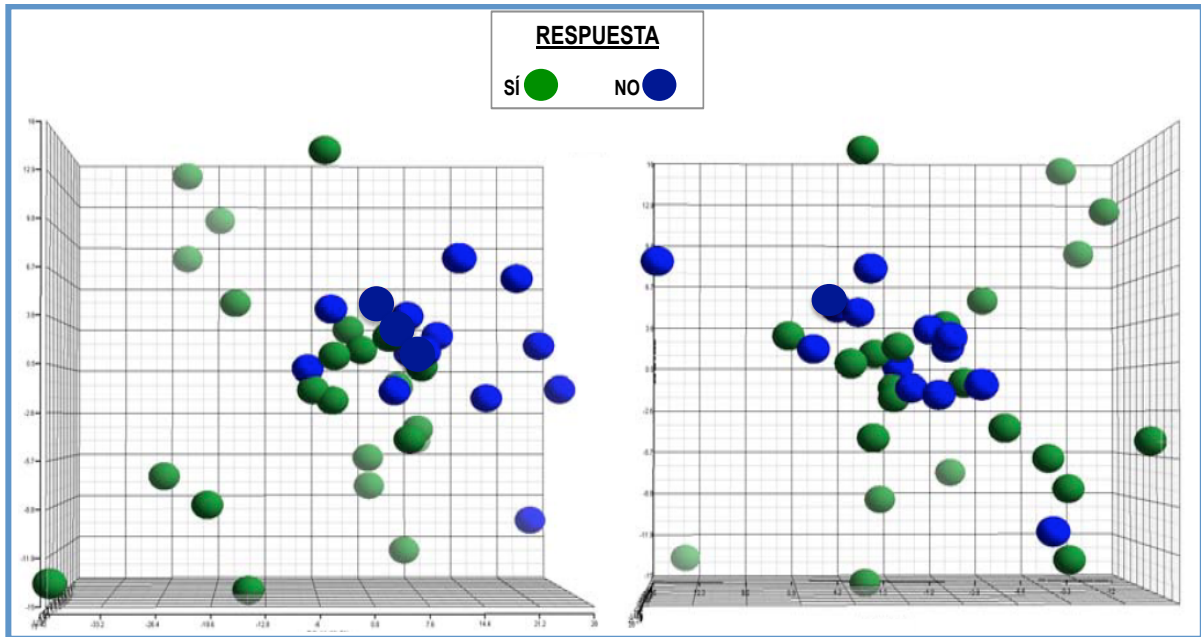
#### **4.3 ANALISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN FUNCIÓN DE LA RESPUESTA A LA QT**

Se analizaron los resultados de expresión génica obtenidos a partir de las 37 muestras de ARN procedentes de CCR humano. Las muestras se clasificaron para el análisis en función de la respuesta a la QT de primera línea, considerando a los pacientes respondedores ( $R=RC+RP$ ; 23 pacientes [62%]) o no respondedores ( $NR=EE+PE$ ; 14 pacientes [38%]) según los criterios RECIST 1.0 (Tabla 10).

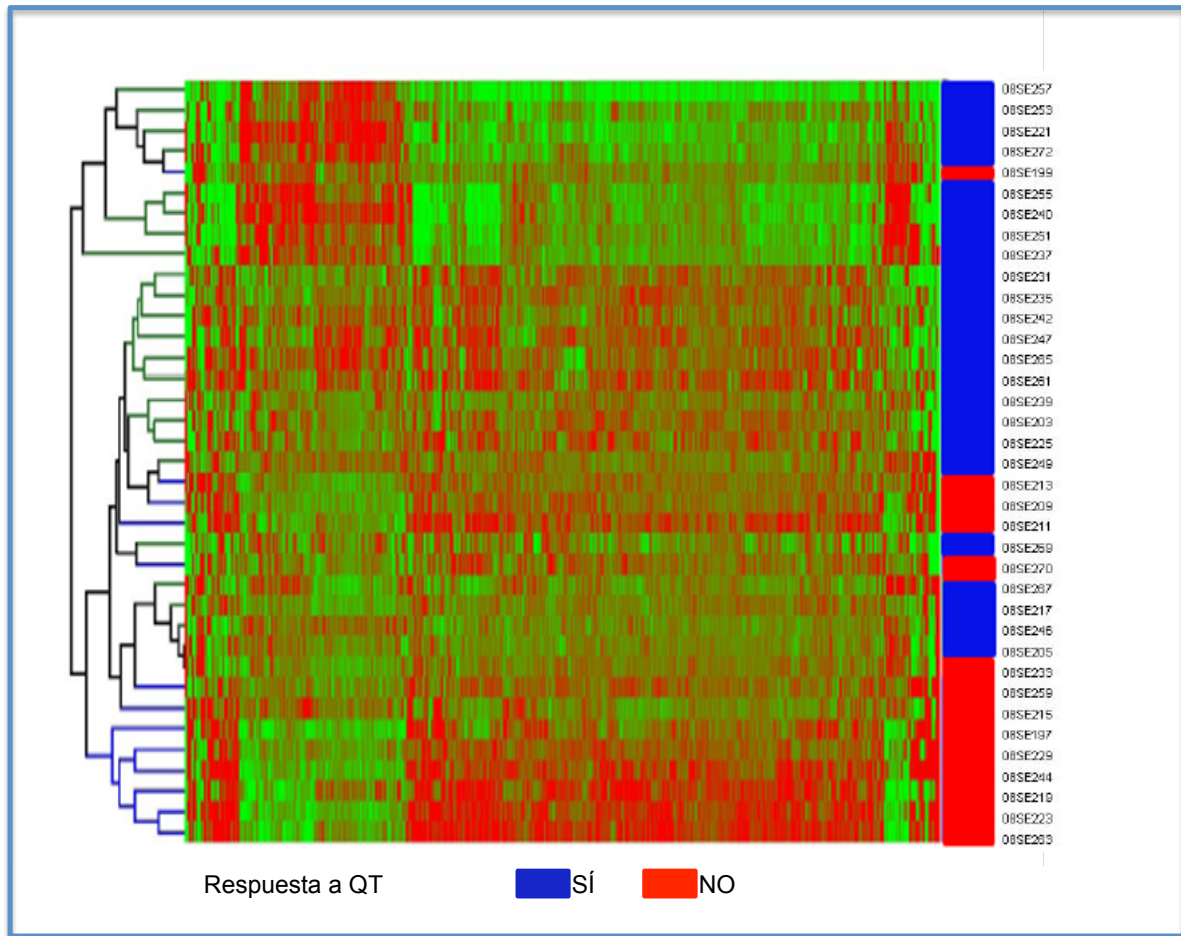
Para analizar la significación de los cambios de expresión observados entre ambas condiciones (pacientes R y NR a la QT), se aplicó el modelo de regresión

lineal descrito en “Material y métodos”. En este estudio, con una lista de trabajo inicial de 9.619 secuencias, se estimó que el 5% podrían ser falsos positivos. Tras comparar los perfiles de expresión de R vs NR y aplicar el test de corrección múltiple de Bonferroni, obtuvimos 595 secuencias diferencialmente expresadas entre ambas condiciones.

A continuación se realizó un análisis de componentes principales [PCA (*Principal Component Analysis*)] y un clúster jerárquico supervisado para valorar si existía segregación de las muestras de acuerdo a su condición de R o NR a la QT. Como se ilustra en las figuras 8 y 9, se observó un conjunto de genes diferencialmente expresados entre los dos grupos de pacientes (R vs NR a la QT), a pesar de que la separación entre ambas condiciones no estaba perfectamente definida.



**Figura 8. Dos visiones de PCA: A) Columna izquierda - primera visión de PCA. B) Columna derecha - visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3).** Realizada a partir de la lista de 595 secuencias diferencialmente expresadas ( $p < 0.05$ ) entre respondedores (muestra representada como punto verde) y no respondedores (muestra representada como punto azul). Porcentaje de variabilidad: 39.5% (eje 1), 8.72% (eje 2); 5.78% (eje 3).



**Figura 9. Clúster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de la lista de 595 secuencias diferencialmente expresadas entre R y NR con un valor de  $p < 0.05$ . Cada grupo de respuesta está representado por color (azul los respondedores y rojo los no respondedores).**

#### **4.4 ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN FUNCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA**

A continuación analizamos la correlación existente entre la expresión desregulada de los genes y la supervivencia libre de progresión (SLP). La SLP es un parámetro alternativo útil para explorar la sensibilidad a un determinado tratamiento, ya que los pacientes que alcanzan una respuesta objetiva o una estabilización prolongada tendrán una SLP más prolongada que aquellos refractarios al tratamiento y que experimentan, en consecuencia, una progresión precoz o una estabilización de corta duración (Saad et al, 2010; Booth and Eisenhauer, 2012).

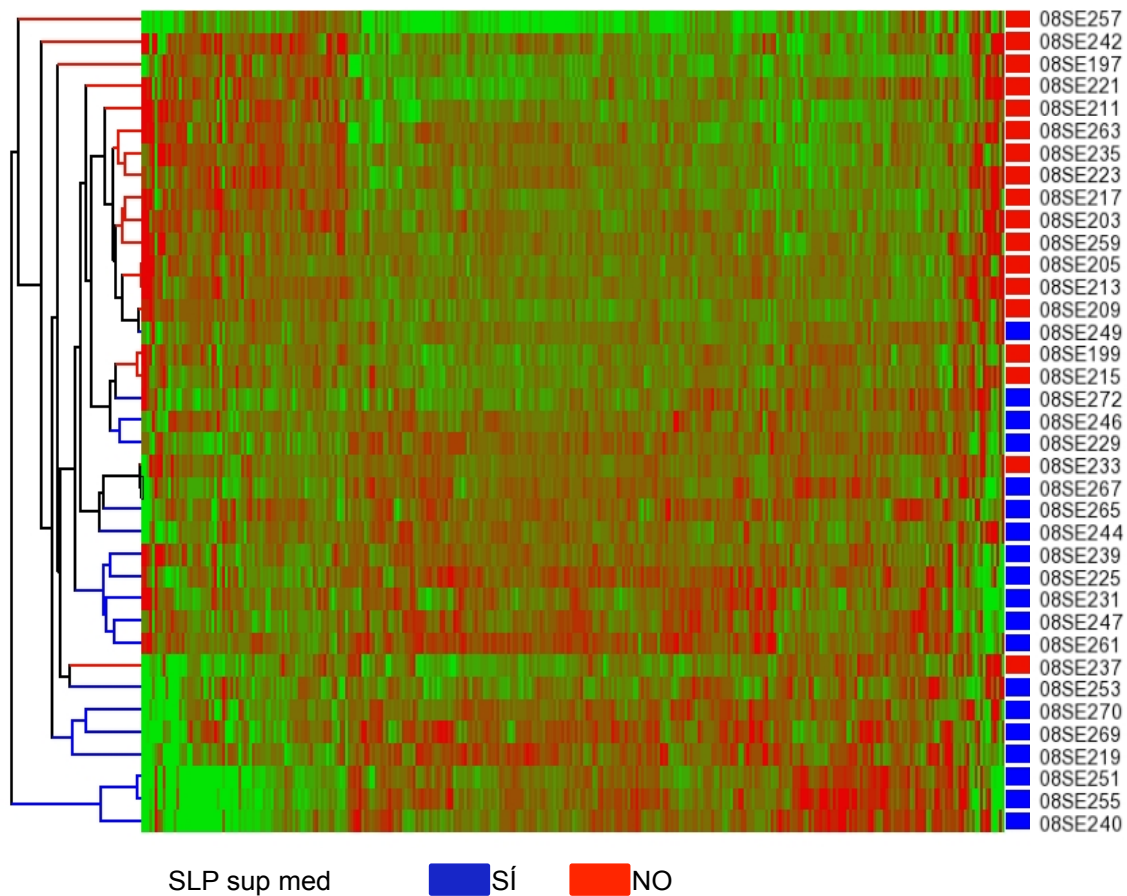
Por este motivo se procedió, como análisis exploratorio complementario, a evaluar los patrones de expresión génica clasificando a los pacientes en dos categorías: los pacientes que presentaban una SLP corta, definida como menor o igual a la mediana (11.13 meses), y los pacientes con una SLP larga (mayor a la mediana). De los 37 pacientes, 19 (51.3%) presentaron una larga SLP y 18 (48.7%) una corta SLP (Tabla 10). Quince de los 19 pacientes (79%) con una SLP prolongada habían experimentado una respuesta objetiva con el tratamiento, y 15 de los 23 pacientes (65%) que habían alcanzado una respuesta objetiva con el tratamiento presentaron una SLP prolongada.

**Tabla 10. Respuesta tumoral objetiva y SLP por paciente.**

<b>Código proyecto</b>	<b>Respuesta a la QT de 1ª línea</b>	<b>SLP mayor que la mediana (11.53 meses)</b>
08SE197	No	No
08SE199	No	No
08SE203	Sí	No
08SE205	Sí	No
08SE209	No	No
08SE211	No	No
08SE213	No	No
08SE215	No	No
08SE217	Sí	No
08SE219	No	Sí
08SE221	Sí	No
08SE223	No	No
08SE225	Sí	Sí
08SE229	No	Sí
08SE231	Sí	Sí
08SE233	No	No
08SE235	Sí	No
08SE237	Sí	No
08SE239	Sí	Sí
08SE240	Sí	Sí
08SE242	Sí	No
08SE244	No	Sí
08SE246	Sí	Sí
08SE247	Sí	Sí
08SE249	Sí	Sí
08SE251	Sí	Sí
08SE253	Sí	Sí
08SE255	Sí	Sí
08SE257	Sí	No
08SE259	No	No
08SE261	Sí	Sí
08SE263	No	No
08SE265	Sí	Sí
08SE267	Sí	Sí
08SE269	Sí	Sí
08SE270	No	Sí
08SE272	Sí	Sí

Tras la realización de un clúster jerárquico supervisado, observamos patrones de expresión génica diferenciales entre los pacientes que presentaban una SLP mayor que la mediana con respecto a aquellos que presentaban una SLP menor o igual a la mediana (Figura 10). Al aplicar los test estadísticos, se

identificaron 318 secuencias diferencialmente expresadas entre ambas condiciones experimentales ( $p < 0.05$ ).

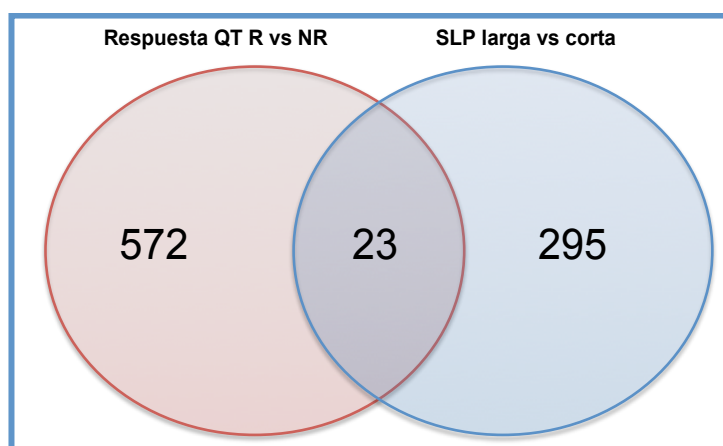


**Figura 10. Clúster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de la supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes con CCRm. Cada grupo está representado por un color en función de la SLP (azul SLP superior a la mediana y rojo SLP inferior o igual a la mediana).**



## **5. SELECCIÓN DE GENES PARA VALIDACIÓN**

Se compararon los resultados obtenidos en los pacientes estratificados según la respuesta a la QT con los obtenidos según la SLP. A partir de estos datos, se seleccionó un panel de 161 genes para su posterior validación, basándonos en la magnitud de la expresión relativa (*fold-change*), la significación estadística obtenida, la concordancia entre ambos análisis (respuesta objetiva a la QT y SLP) (Figura 11), así como en su relevancia biológica en el CCR. En la Tabla 11 se detalla el listado completo de los 161 genes seleccionados.



**Figura 11. Genes desregulados identificados en pacientes con CCRm estratificados en función de la respuesta a la QT y de la SLP.**

**Tabla 11. Listado de los 161 genes seleccionados para validación.**

Nº	Gen	Código	Nº	Gen	Código	Nº	Gen	Código
1	ADCY9	Hs00181599_m1	56	GFOD1	Hs00255879_m1	111	RARA	Hs00940446_m1
2	AKAP13	Hs00180747_m1	57	GOLGA2	Hs00366395_m1	112	RB1CC1	Hs00207547_m1
3	AKR1C1	Hs00413886_m1	58	GRK5	Hs00992173_m1	113	RBCK1	Hs00246291_m1
4	ANKRD11	Hs00203193_m1	59	H2AFV	Hs00370894_m1	114	RBM25	Hs00402198_m1
5	AP3D1	Hs00187577_m1	60	HMBS	Hs00609297_m1	115	RBM27	Hs00325150_m1
6	AQP1	Hs00166067_m1	61	HMGA2	Hs00171569_m1	116	REG3A	Hs00170171_m1
7	ARHGAP18	Hs00364379_m1	62	HOXB8	Hs00256885_m1	117	RHEB	Hs00950800_m1
8	AURKB	Hs00177782_m1	63	IFNAR2	Hs00174198_m1	118	ROBO1	Hs00268049_m1
9	BCAP29	Hs00218964_m1	64	IGFBP4	Hs00181767_m1	119	RSF1	Hs00213155_m1
10	BCKDHB	Hs00609053_m1	65	IRF5	Hs00158114_m1	120	RUFY3	Hs01127885_m1
11	BIK	Hs00154189_m1	66	IRX2	Hs01383002_m1	121	SAMD4B	Hs00216043_m1
12	BRD2	Hs01121984_m1	67	ITGB8	Hs01110394_m1	122	SCG5	Hs00161638_m1
13	BUB3	Hs00190920_m1	68	ITPR2	Hs00181916_m1	123	SEC14L1	Hs00608163_m1
14	C8orf84	Hs00541931_m1	69	JAG1	Hs01070032_m1	124	SECISBP2L	Hs00299746_m1
15	CA9	Hs00154208_m1	70	JAK1	Hs01026983_m1	125	SEPT10	Hs00536793_m1
16	CALD1	Hs00921982_m1	71	KIAA1033	Hs00405266_m1	126	SEPT6	Hs00248408_m1
17	CBR3	Hs01025918_m1	72	KLK11	Hs01100849_m1	127	SFRS2IP	Hs00190882_m1
18	CBWD3	Hs00414276_m1	73	KSR1	Hs00300134_m1	128	SGK223	Hs00410725_m1
19	CBX6	Hs00204726_m1	74	LGALS8	Hs00374634_m1	129	SKAP2	Hs00182698_m1
20	CCL14	Hs00234981_m1	75	LONP1	Hs00270514_m1	130	SLC12A2	Hs00169032_m1
21	CCL20	Hs01011368_m1	76	LRRFIP1	Hs01589950_m1	131	SLC19A2	Hs00949693_m1
22	CDC25A	Hs00947994_m1	77	LUC7L3	Hs00212659_m1	132	SLC6A8	Hs00940515_m1
23	CDK4	Hs00175935_m1	78	MAD1L1	Hs00269119_m1	133	SPEN	Hs00209232_m1
24	CDK6	Hs01026371_m1	79	MAST4	Hs00382423_m1	134	SRRM2	Hs00909904_m1
25	CEL	Hs01068709_m1	80	MLL	Hs00610538_m1	135	STARD13	Hs00364555_m1
26	CEP57	Hs00206534_m1	81	MMP12	Hs00899662_m1	136	TAOK1	Hs00687856_m1
27	CHCHD6	Hs00260562_m1	82	MRPL30	Hs00375034_m1	137	TCEB3	Hs00162605_m1
28	CHD4	Hs00172349_m1	83	MRPL50	Hs00747929_m1	138	TCF25	Hs00248217_m1
29	CLEC3B	Hs00162844_m1	84	MTHFD1L	Hs00383616_m1	139	TENC1	Hs00539247_m1
30	CSNK1A1	Hs00793391_m1	85	MTHFD2	Hs00741165_m1	140	TGFBR3	Hs01114253_m1
31	CXCL10	Hs00171042_m1	86	N4BP2L1	Hs00410686_m1	141	TGIF1	Hs00545014_m1
32	CXCL1	Hs00236937_m1	87	NAV1	Hs00368110_m1	142	TM7SF2	Hs00162807_m1
33	CYP4X1	Hs00380077_m1	88	NBN	Hs00159537_m1	143	TOP1	Hs00243257_m1
34	CYP51A1	Hs00426415_m1	89	NBPF14;	Hs00429706_m1	144	TPP1	Hs00166099_m1
35	DBR1	Hs00211958_m1	90	NCOA3	Hs00180722_m1	145	TRAK2	Hs00209308_m1
36	DCK	Hs01040726_m1	91	NEK4	Hs00177323_m1	146	UBC	Hs00824723_m1
37	DDAH2	Hs00203889_m1	92	NFAT5	Hs00232437_m1	147	UBN1	Hs00213514_m1
38	DEFA5	Hs00360716_m1	93	NIPBL	Hs00209846_m1	148	UBXN4	Hs00412682_m1
39	DIDO1	Hs01123468_m1	94	NR2F2	Hs01047078_m1	149	UGCG	Hs00234293_m1
40	DNAJB6	Hs00369717_m1	95	NRBP2	Hs00297825_m1	150	UNG	Hs00422172_m1
41	DNAJC3	Hs00939345_m1	96	PALM2-AKAP2	Hs00904182_m1	151	USP16	Hs00170791_m1
42	DUSP27	Hs01367756_m1	97	PCDHGC3	Hs00159905_m1	152	USP47	Hs00215725_m1
43	DYRK4	Hs00381634_m1	98	PCNA	Hs00696862_m1	153	VSNL1	Hs02386966_m1
44	ECT2	Hs00216455_m1	99	PCSK1	Hs01026107_m1	154	WARS2	Hs00210571_m1
45	EDNRB	Hs00240747_m1	100	PDZK1IP1	Hs00906696_m1	155	WHSC1L1	Hs00256555_m1
46	EIF2C2	Hs01085579_m1	101	PHPT1	Hs00387773_m1	156	WSB1	Hs00373204_m1
47	EPS15	Hs00179978_m1	102	PIP5K1B	Hs00185914_m1	157	WWC2	Hs00227904_m1
48	FAF1	Hs00169544_m1	103	PKDCC	Hs00293125_m1	158	WWC3	Hs01025933_m1
49	FASN	Hs01005622_m1	104	PPAP2B	Hs00170359_m1	159	XIST	Hs01079824_m1
50	FBLIM1	Hs00378472_m1	105	PPP1R10	Hs00160391_m1	160	ZC3H11A	Hs00207986_m1
51	FBXO9	Hs00202596_m1	106	PPP1R15B	Hs00262481_m1	161	ZNF148	Hs00222661_m1
52	FOXP2	Hs00362817_m1	107	PPP2R2A	Hs00160392_m1			
53	GAPDH	Hs99999905_m1	108	PROS1	Hs00165590_m1			
54	GAS7	Hs00932959_m1	109	PSAT1	Hs00253548_m1			
55	GCH1	Hs00609198_m1	110	PTPRD	Hs00369913_m1			

## **6. VALIDACIÓN DEL PERFIL GENÉTICO PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QT EN UNA COHORTE INDEPENDIENTE DE PACIENTES CON CCRm**

Para examinar la reproducibilidad y validar los resultados obtenidos del análisis de expresión génica de los microarrays, se utilizó la técnica de qRT-PCR.

Ciento sesenta y un genes fueron seleccionados para validación en una cohorte multi-institucional independiente de 53 pacientes con CCRm, según lo descrito en el apartado “Material y métodos”. Los pacientes se estratificaron en función de la respuesta alcanzada con la QT de primera línea (R vs NR) siguiendo los mismos criterios que en la cohorte de desarrollo inicial.

Tras la realización de la técnica y el análisis mediante el software StatMiner v.4.2, 7 de los 161 genes demostraron estar diferencialmente expresados ( $p$  ajustada  $<0.05$ ) entre aquellos pacientes que alcanzaron respuesta objetiva con la QT con respecto a los que no lo hicieron. Los genes identificados fueron *DCK*, *DNAJC3*, *NAV1*, *NIPBL*, *PALM2*, *VSNL1* y *WHSC1L1*. De estos siete genes validados, seis habían sido seleccionados a partir del cluster de respuesta (*DCK*, *NAV1*, *NIPBL*, *PALM2*, *VSNL1* y *WHSC1L1*), mientras que un gen (*DNAJC3*) se encontró desregulado tanto en el cluster de respuesta como en el de SLP.

Todos los genes mostraron mayores niveles de expresión en los pacientes respondedores comparados con los no respondedores de forma estadísticamente significativa. En la Tabla 12 se detallan los genes validados, el valor de  $p$  ajustado para cada uno de ellos y el valor de expresión relativa (*fold change*) para cada uno de ellos.

**Tabla 12. Genes predictivos de la respuesta a la QT validados mediante qRT-PCR en una cohorte independiente de pacientes con CCRm.**

Gen	Gen ID	R vs NR (- $\Delta\Delta$ Ct)	Valor de p ajustados*	Fold-change (expresión relativa)
<b>DCK</b>	1633	1.300	0.035	2.46
<b>DNAJC3</b>	5611	1.621	0.008	3.08
<b>NAV1</b>	89796	1.231	0.035	2.35
<b>NIPBL</b>	25836	1.310	0.035	2.48
<b>PALM2</b>	445815	1.237	0.040	2.36
<b>VSNL1</b>	7447	1.552	0.009	2.93
<b>WHSC1L1</b>	54904	1.249	0.035	2.38

Los pacientes tratados con quimioterapia (QT) se estratificaron en dos grupos: 1) respondedores (R), que incluye a los pacientes con respuesta completa o parcial, o 2) No respondedores (NR), que incluye a los pacientes con enfermedad estable o en progresión, de acuerdo con los criterios RECIST 1.0.

\*Los valores de p se ajustaron mediante el test múltiple de Benjamini-Hochberg.

Gene ID: Número Genbank

## **7. CLASIFICACIÓN PREDICTIVA DE RESPUESTA A LA QT EN BASE A LA FIRMA DE 7 GENES**

Para facilitar la interpretación de los resultados y conseguir su aplicabilidad a la práctica clínica habitual, se analizaron las tasas de respuesta a la QT y la supervivencia de los pacientes en base a la expresión de estos 7 genes, cuya expresión fue dicotomizada por encima o por debajo de la mediana de expresión en cada caso. Desarrollamos una clasificación (*score*) de riesgo individual para cada paciente de 0 a 7, considerando un punto positivo por cada gen cuya expresión se encontrase por encima de la mediana y, por tanto, fuera predictiva de una respuesta objetiva a la QT.

De esta forma agrupamos a los pacientes en dos grupos de riesgo:

- Grupo de mal pronóstico o score bajo (score 0-3): Pacientes que presentaban de 0 a 3 de los genes con expresión favorable o predictiva de respuesta objetiva a la QT.

- Grupo de buen pronóstico o score alto (score 4-7): Pacientes que presentaban de 4 a 7 de los genes con expresión favorable o predictiva de respuesta objetiva a la QT.

La correlación entre la respuesta a la QT y los dos grupos de riesgo fue evaluada mediante el test de  $\chi^2$  (tabla 13). La tasa de respuesta de los pacientes del grupo de buen pronóstico fue significativamente superior comparada con los de mal pronóstico (58% vs 13%, P=0.024).

**Tabla 13. Tasa de respuesta a la QT según la clasificación predictiva de 7 genes.**

	<b>NR a QT</b>	<b>R a QT</b>	<b>p</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
<b>Firma de mal pronóstico (score bajo 0-3)</b>	7 (87)	1 (13)	
<b>Firma de buen pronóstico (score alto 4-7)</b>	19 (42)	26 (58)	0.024

NR: no respuesta; R: respuesta; QT: quimioterapia

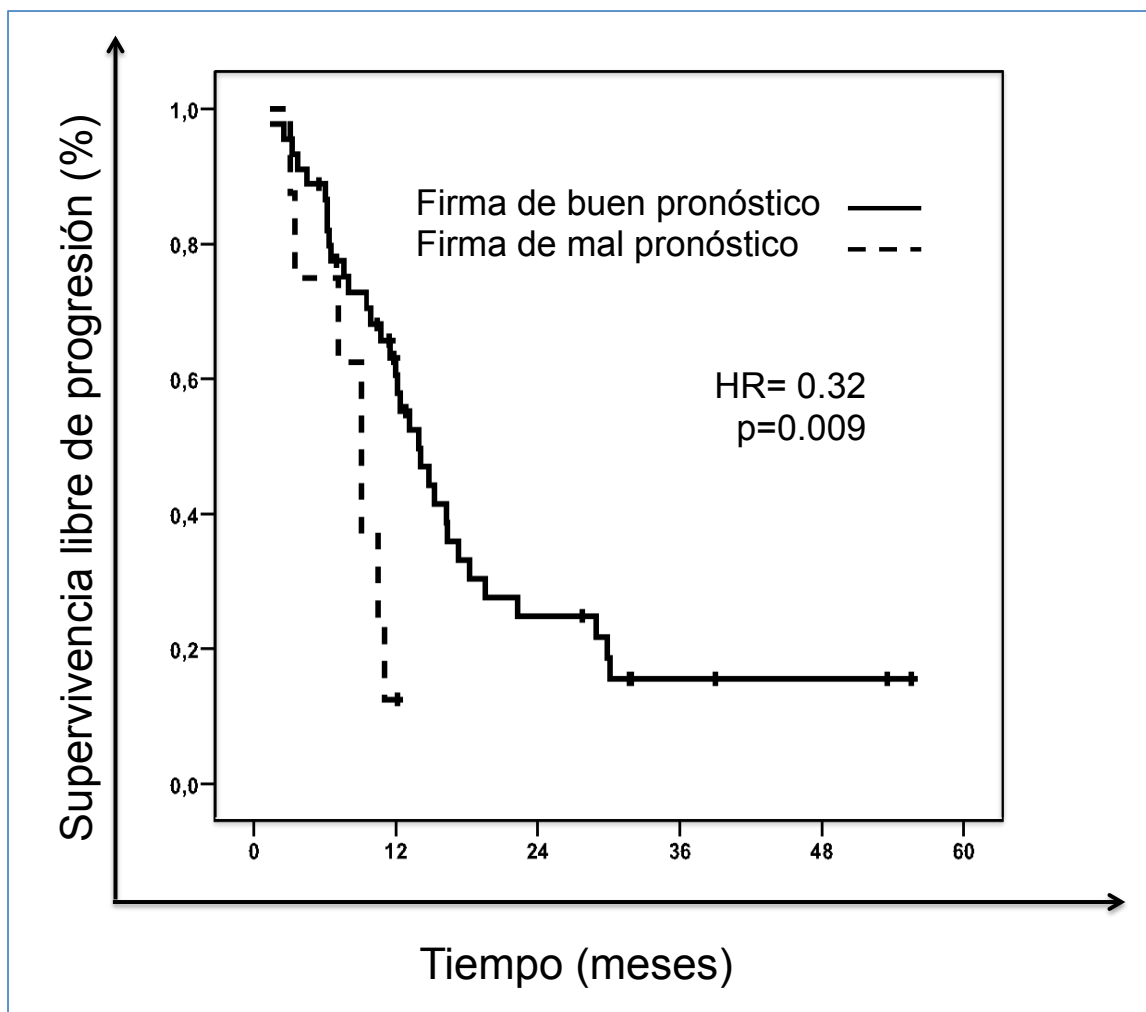
Posteriormente analizamos la SLP y la SG en función de la clasificación de riesgo (Tabla 14). Los pacientes del grupo de mal pronóstico presentaron una mediana de SLP de 9.1 meses, mientras que los del grupo de buen pronóstico alcanzaron una mediana de 13.9 meses. El porcentaje de pacientes con SLP a un año fue significativamente mejor en los pacientes del grupo de buen pronóstico

(61% vs 13%; HR=0.32; p=0.009). En la figura 12 se muestran las curvas de SLP según los grupos de riesgo.

**Tabla 14. Regresión de Cox para SLP y SG según la clasificación predictiva de 7 genes.**

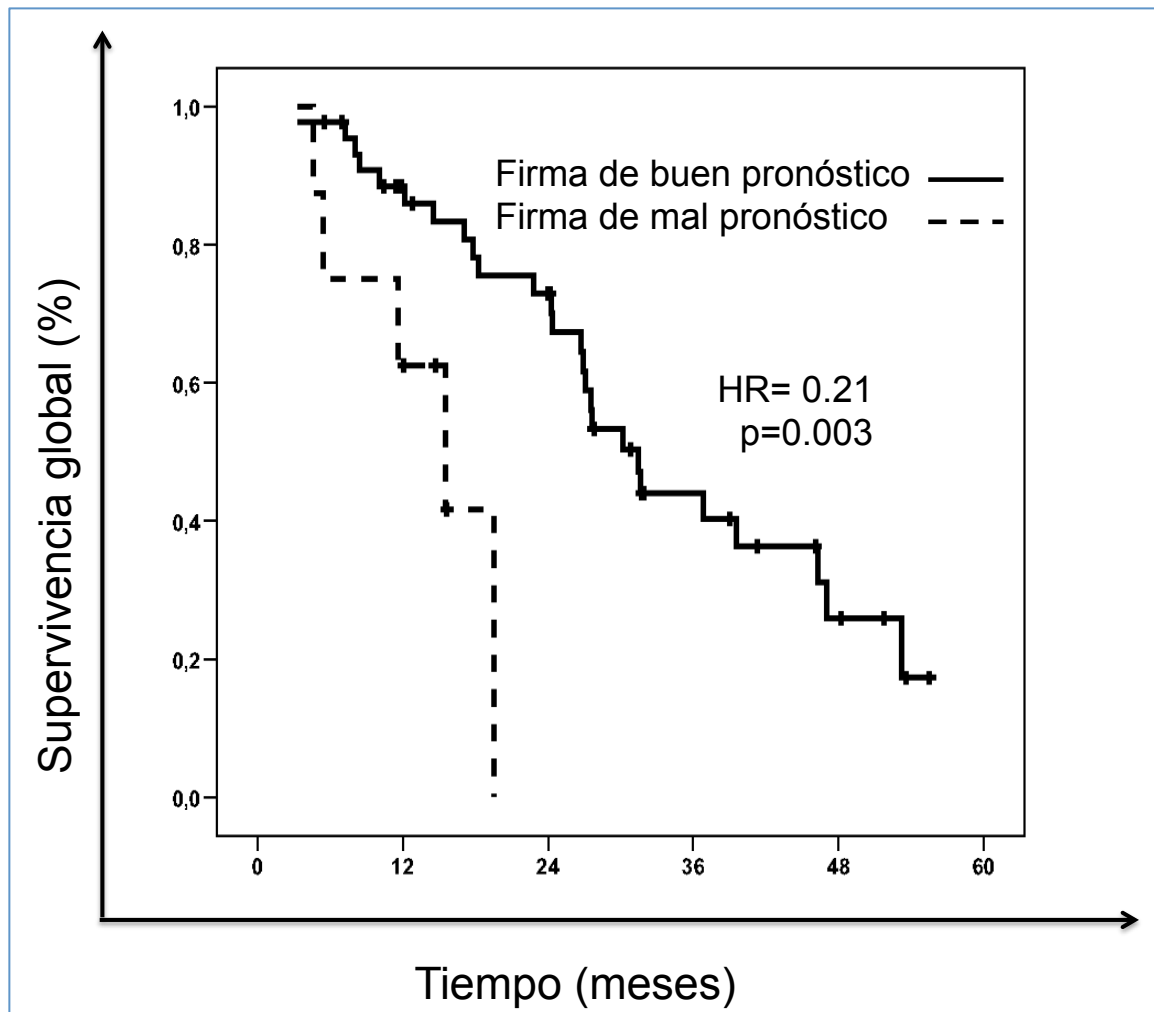
	SLP			SG		
	Mediana (meses)	HR	P	Mediana (meses)	HR	P
<b>Firma de mal pronóstico (score bajo 0-3)</b>	9.1			15.5		
<b>Firma de buen pronóstico (score alto 4-7)</b>	13.9	0.32	0.009	31.5	0.21	0.003

HR: hazard ratio; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global



**Figura 12. Supervivencia libre de progresión en función de los niveles de expresión de los 7 genes.** La línea negra representa a los pacientes con firma de buen pronóstico (score alto: 4-7 genes con expresión favorable o predictiva de respuesta a la QT). La línea punteada representa a los pacientes con firma de mal pronóstico (score bajo: 0-3 genes con expresión favorable o predictiva de respuesta a la QT).

La mediana de SG de los pacientes del grupo de mal pronóstico fue de 15.5 meses, mientras que los del grupo de buen pronóstico alcanzaron una mediana de 31.5 meses. Al igual que en el caso de la SLP, el porcentaje de pacientes vivos al año fue significativamente mayor en el grupo de buen pronóstico comparado con el de mal pronóstico (89% vs 63%; HR=0.21; p=0.003)(Figura 13).



**Figura 13. Supervivencia global en función de los niveles de expresión de los 7 genes.** La línea negra representa a los pacientes con firma de buen pronóstico (score alto: 4-7 genes con expresión favorable o predictiva de respuesta a la QT). La línea punteada representa a los pacientes con firma de mal pronóstico (score bajo: 0-3 genes con expresión favorable o predictiva de respuesta a la QT).

## **8. FUNCION BIOLÓGICA O MOLECULAR DE LOS GENES VALIDADOS.**

Se emplearon los programas informáticos descritos en la sección “Material y métodos” y la base de datos del NCBI para una interpretación biológica de los



resultados obtenidos, y se realizó una búsqueda bibliográfica detallada de los 7 genes.

De acuerdo con la clasificación GeneOntology (Ashburner et al, 2000), los genes validados están implicados en las siguientes funciones biológicas o vías moleculares: metabolismo de nucleótidos y ácido fólico (*DCK*), unión a chaperonas y regulación de mecanismos celulares de respuesta al estrés (*DNAJC3*), formación de los haces de microtúbulos y control de la migración celular (*NAV1*), mantenimiento de células madre, control de la replicación y reparación del ADN y de la segregación cromosómica (*NIPBL*), control de la dinámica de membrana y de la forma celular (*PALM2*), transporte y unión a iones (*VSNL1*), organización de la cromatina y regulación de la transcripción (*WSHC1L1*). La Tabla 15 muestra una descripción detallada de cada uno de los genes y las clases funcionales a las que pertenecen.

**Tabla 15. Firma génica predictiva de respuesta a QT: Descripción y función de los 7 genes implicados**

<b>Identificador Applied Biosystems</b>	<b>Gen</b>	<b>Nombre Oficial del Gen</b>	<b>Nº GeneBank</b>	<b>Descripción de Procesos Biológicos (PB) y Función Molecular (FM) según GO</b>
203302_at	<i>DCK</i>	deoxycytidine kinase	1633	PB: Metabolismo de nucleótidos. FM: Actividad deoxicitidina kinasa. Unión al ATP.
208499_s_at	<i>DNAJC3</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	5611	PB: Respuesta inmune a virus, procesos catabólicos. FM: Unión a chaperonas, unión a proteínas con plegamiento anómalo, inhibición de protein-kinasas.
224771_at	<i>NAV1</i>	neuron navigator 1	89796	PB: migración neuronal, formación de haces de microtúbulos. FM: unión a nucleótidos.
242352_at	<i>NIPBL</i>	Nipped-B homolog		PB: desarrollo embrionario, mantenimiento de células madre, respuesta a estímulos dañinos al ADN, regulación negativa de la transcripción ADN-dependiente, regulación positiva de la deacetilación de histonas. FM: unión a cromatina, unión a histonas-deacetilasas, unión a complejos mediadores, unión a proteínas (C-terminus y N-terminus)
202760_s_at	<i>PALM2</i>	PALM2-AKAP2 readthrough	25836	PB: regulación de la forma celular.
203798_s_at	<i>VSNL1</i>	visinin-like 1	445815	FM: Unión a iones calcio.
222544_s_at	<i>WHSC1L1</i>	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	7447	PB: Diferenciación y crecimiento celular, metilación de histona-lisina, regulación de la transcripción ADN dependiente. FM: Actividad histona-lisina N-metiltransferasa, unión a iones zinc.
			54904	

# Discusión



# Discusión

---

El CCR es una de las neoplasias más frecuentes en los países desarrollados y constituye una de las principales causas de muerte por cáncer. Aproximadamente un tercio de los pacientes presentan enfermedad metastásica al diagnóstico, y un 40% de los diagnosticados en estadios iniciales recidivan tras la cirugía. A pesar de los importantes avances diagnósticos y terapéuticos experimentados en los últimos años, una vez que el tumor progresa y no es subsidiario de resección quirúrgica, la enfermedad se considera incurable. El tratamiento estándar de primera línea del CCRm consiste en distintas combinaciones de fluoropirimidinas y oxaliplatino o irinotecan, asociadas o no a anticuerpos monoclonales dirigidos contra el VEGF o EGFR que han sido incorporados al arsenal terapéutico en los últimos años. El aumento en la esperanza de vida de los pacientes con CCRm, el incremento de las opciones terapéuticas disponibles, la toxicidad no desdeñable de los fármacos, y su elevado coste en el contexto de un sistema sanitario con restricciones económicas crecientes, hace más imperiosa que nunca la necesidad de identificar marcadores moleculares que nos ayuden a mejorar el balance beneficio/riesgo de los tratamientos en este contexto. Sin embargo, con la excepción de las mutaciones en KRAS/NRAS como predictores de resistencia a la terapia anti-EGFR, no existen en el momento actual biomarcadores validados en el CCR que faciliten al oncólogo la selección del esquema de tratamiento más adecuado para cada paciente.

La identificación de marcadores moleculares predictivos de respuesta a la QT en el CCR ha sido el objetivo de numerosos estudios en las dos últimas décadas. La alteración de la expresión de diversos genes o proteínas han sido relacionados con la sensibilidad y/o riesgo de toxicidad de los principales fármacos citotóxicos

empleados en el tratamiento del CCR, como son las fluoropirimidinas, el oxaliplatino o el irinotecan.

Los fármacos más extensamente estudiados han sido las fluoropirimidinas, y en particular el 5-FU. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición competitiva de la timidilato sintetasa (TS) a través de su conversión intracelular a su principal metabolito activo, la 5-fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP). La TS es la enzima limitante de la síntesis de *ново* de deoxitimidina-monofosfato (dTMP), necesaria para la síntesis de DNA. Experimentos *in vitro* han demostrado una correlación inversa entre la expresión de TS y la sensibilidad a las fluoropirimidinas, de manera que su sobre-expresión genera resistencia a estos fármacos. Sin embargo, los resultados de múltiples estudios clínicos que han evaluado la relación entre la expresión proteica de TS mediante análisis inmunohistoquímico, o la expresión de ARNm mediante RT-PCR, y la resistencia al 5-FU no han alcanzado la consistencia necesaria para recomendar su empleo rutinario en la clínica (Popat, 2004; Lurje, 2009). Otro marcador relevante en relación a la toxicidad de este fármaco es la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), la enzima limitante del metabolismo del 5-FU. Los pacientes con variantes alélicas del gen que dan lugar a una baja expresión de DPD (3-5% de la población general) desarrollan toxicidades muy severas, incluso letales, cuando reciben tratamiento con fluoropirimidinas (diarrea, neutropenia y síndrome de mano-pie) (van Kuilenburg, 2004). Por el contrario, unos niveles elevados de DPD darían lugar a una inactivación excesiva del 5FU y, por lo tanto, se asociarían con menor eficacia del fármaco y peor pronóstico de la enfermedad. No obstante, los datos publicados en este sentido no han sido concluyentes (Walther, 2009) (Salonge, 2000).

El irinotecan es un inhibidor de la topoisomerasa 1 (TOP1) que es convertido mediante carboxilesterasas a su principal metabolito, el SN-38, de 100 a 1000 veces más potente que el irinotecan. El SN-38 es posteriormente conjugado por las uridin-difosfato-glucuronosil-transferasas (UGT) y excretado por la bilis como metabolito inactivo (SN-38G). Niveles elevados de expresión de TOP1, su principal diana terapéutica, se han relacionado con una mayor sensibilidad a este fármaco en estudios preclínicos y algunos ensayos clínicos realizados en pacientes con CCR avanzado tratados con esquemas basados en irinotecan (Braun, 2008; Kostopoulos, 2009). No obstante, otros estudios de similar diseño no han confirmado estos hallazgos (Koopman et al, 2009). Por otro lado, existen variantes génicas de la UGT que dan lugar a una actividad enzimática reducida y, en consecuencia, a una menor conjugación del SN-38 y a una mayor exposición al principal metabolito activo del irinotecan. Se ha demostrado que los portadores homocigotos de estas variantes génicas (UGT1A1\*28) desarrollan toxicidades mucho más severas cuando son tratados con irinotecan (Palomaki et al, 2009). Por ello hay autores que recomiendan tratar con dosis reducidas de irinotecan a estos pacientes. No obstante, hay estudios que sugieren que el irinotecan es también más eficaz en estos individuos, por lo que esta recomendación podría ser cuestionada. Esto ilustra, al igual que en el caso de la DPD, la íntima relación entre toxicidad y eficacia de los fármacos antineoplásicos y la dificultad de manejo de estos fármacos de estrecho margen terapéutico.

Oxaliplatino forma aductos con el DNA inhibiendo su replicación. Este tipo de daño en el DNA es reparado en la célula por el sistema de reparación por excisión de nucleótidos o NER (del inglés *nucleotide excision repair*). En este proceso de reparación, en el cual están implicadas más de 30 proteínas, la enzima ERCC1

(*excision repair cross complementing 1*) juega un papel fundamental estabilizando la endonucleasa XPF (xeroderma pigmentosum group F) responsable de la excisión del fragmento de DNA dañado. En estudios preclínicos se ha documentado la correlación entre los niveles de ERCC1 y la susceptibilidad de las células al oxaliplatino, de manera que a menor actividad de esta enzima mayor sensibilidad al fármaco. En series clínicas no controladas se ha observado que una baja expresión de ERCC1 (mRNA o proteína) se asocia con una mayor supervivencia en pacientes con cáncer de colon avanzado tratados con oxaliplatino (Liang et al, 2010; Yin et al, 2011). Sin embargo, en análisis retrospectivos de ensayos clínicos controlados en los cuales los pacientes eran aleatorizados a recibir o no oxaliplatino (FOCUS, CAIRO), la expresión de ERCC1 no fue predictiva del beneficio incremental de añadir oxaliplatino a un tratamiento con fluoropirimidinas (Braun et al, 2008; Koopman et al, 2009).

Por lo tanto, desafortunadamente, ninguno de los biomarcadores evaluados hasta la fecha relacionados con la quimioterapia citotóxica convencional ha podido ser incorporado a la práctica clínica debido a su limitada capacidad predictiva y a la ausencia de reproducibilidad de los resultados. Estas discrepancias no son de extrañar ya que la sensibilidad a un determinado tratamiento es el resultado de la compleja interacción de múltiples factores, dependientes tanto del paciente como del tumor, que en último término determinan la biodisponibilidad del fármaco en el individuo y su efecto farmacodinámico en las células neoplásicas y normales, así como la respuesta celular al daño causado por el mismo. La heterogeneidad de las poblaciones estudiadas y de las metodologías empleadas, junto con la utilización habitual de esquemas de poliquimioterapia en el tratamiento del CCR complica aún más este escenario. En el contexto de esta realidad biológica compleja, las firmas



genéticas que incorporan múltiples genes es más probable que tengan mayor precisión predictiva que los marcadores formados por un único gen (Brettingham-Moore et al, 2011; Salazar et al, 2011; Mariadason et al,2003).

Los perfiles de expresión génica han demostrado un gran potencial en la investigación de los mecanismos moleculares involucrados en la biología y evolución clínica del cáncer colorrectal. A lo largo de las dos últimas décadas se ha demostrado que los patrones de expresión génica son capaces de diferenciar entre tejido colónico normal, adenomas benignos y adenocarcinomas en distintos estadios tumorales (Nannini et al, 2009), así como predecir el riesgo de un tejido colónico normal de desarrollar CCR (Augenlicht et al, 1991). Recientemente se han publicado varias firmas genéticas capaces de predecir el riesgo de recidiva tumoral en pacientes con CCR resecado en estadios iniciales (Wang et al, 2004; Gray et al, 2011; Kennedy et al, 2011; O'Connell et al, 2010; Kopetz et al, 2015 Sinicrope et al, 2015). Estas firmas, como Oncotype Dx ® o ColoPrint®, han demostrado mejorar la capacidad pronóstica respecto a las clasificaciones convencionales basadas en características clínicas y patológicas. Sin embargo, la utilidad de esta tecnología para predecir la respuesta tumoral a la quimioterapia ha sido escasamente evaluada, por lo que la genómica predictiva en el CCR continúa siendo un reto.

El objetivo de nuestro estudio fue el desarrollo y validación de una firma génica capaz de predecir prospectivamente la probabilidad de respuesta tumoral a un esquema de poliquimioterapia convencional basado en fluoropirimidinas. Para ello realizamos análisis de expresión del genoma completo en muestras tumorales de pacientes con CCRm tratados con poliQT, y los genes diferencialmente expresados fueron validados mediante qRT-PCR en una cohorte independiente de pacientes. Identificamos siete genes (*DCK*, *DNAJC3*, *NAV1*, *NIPBL*, *PALM2*, *VSNL1*

y *WSHC1L1*) sobre-expresados de forma significativa en los pacientes que presentaron respuesta a la QT. Con ellos se elaboró una puntuación o score de riesgo que permite discriminar de forma prospectiva aquellos pacientes con CCRm con mayor probabilidad de respuesta a la QT. Así, los pacientes con una firma genética favorable (sobreexpresión de entre 4 y 7 genes de la firma) alcanzaron una tasa de respuesta tumoral objetiva significativamente mayor que aquellos pacientes con una firma genética desfavorable (sobreexpresión de entre 0 y 3 genes) (58% vs 13%, respectivamente,  $p=0.024$ ). Este beneficio en respuesta se tradujo también en un aumento significativo tanto en SLP (61% vs 13% a un año,  $HR=0.32$ ,  $p=0.009$ ), como en SG (32 vs 16 meses,  $HR=0.21$ ,  $p=0.003$ ). Esta firma permite, por lo tanto, identificar un subgrupo de pacientes cuya respuesta a la QT es subóptima, en los cuales se podría plantear, por ejemplo, estrategias terapéuticas alternativas experimentales desde primera línea de tratamiento.

El gen *DCK* (*deoxycytidine kinase*) codifica a la desoxicitidina quinasa (DCK), una enzima necesaria para la fosforilación de numerosos desoxiribonucleósidos y sus análogos nucleósidos, ampliamente utilizados como agentes antivirales y antineoplásicos (por ejemplo la citarabina o la gemcitabina). La fosforilación de estos fármacos es necesaria para su activación a derivados trifosforilados que son citotóxicos, y la deficiencia de DCK se ha correlacionado con resistencia a estas drogas en estudios in vitro llevados a cabo en un amplio panel de líneas celulares de tumores sólidos y hematológicos (van der Wilt, 2003).

*DNAJC3* (*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3*) codifica una proteína cochaperona de BiP (HSPA5; proteína de unión a inmunoglobulinas de cadena pesada), un miembro de la familia de HSP70 localizado en el retículo endoplásmico. Las HSP (Heat Shock Proteins o proteínas de choque térmico) son

un conjunto de proteínas que ayudan a otras proteínas (proteínas cliente) al plegamiento, ensamblaje y transporte a la sublocalización celular donde deben ejercer su función. Favorecen el plegamiento de proteínas sintetizadas de novo y ayudan en el plegamiento correcto de proteínas tras un proceso de desnaturalización. Están implicadas por ello en la respuesta celular a distintas agresiones como el aumento de la temperatura, la presencia de metales pesados o el estrés oxidativo. HSP90 es la proteína de choque térmico más abundante en la célula, y es una ATPasa cuya función está estrechamente regulada por una serie de proteínas que incluyen HSP40 y HSP70, entre otras. Las HSPs (particularmente HSP90) están a menudo sobreexpresadas en las células neoplásicas, ya que el potencial oncogénico de estas células depende en gran medida de su capacidad para sobrevivir en circunstancias adversas del entorno, incluida la hipoxia, la privación de nutrientes, la alteración del pH, o agresiones externas como la radiación o la quimioterapia. La sobre-expresión de HSPs puede además estabilizar distintas proteínas oncogénicas favoreciendo así el desarrollo de un fenotipo maligno (Garcia-Carbonero et al, 2013). La presencia de mutaciones homocigotas con pérdida de función de DNAJC3 se han relacionado con el desarrollo de diabetes tipo I y síndromes neurodegenerativos complejos que incluyen ataxia, daño de primera motoneurona, neuropatía periférica, pérdidas auditivas y atrofia cerebral (Synofzik et al, 2014).

*NAV1 (neuron navigator 1)* es un gen humano homólogo de *unc-53*, un gen implicado en la migración neuronal y formación de circuitos axonales en el *Caenorhabditis elegans*. Se expresa en el cerebro en desarrollo y en el corazón adulto, pero aún no se ha determinado su función ni su relación con la carcinogénesis (Maes, 2002). Se piensa que puede jugar un papel relevante en el

desarrollo y regeneración neuronales.

*NIPBL* (*Nipped-B homolog*) es un gen que actúa como factor regulador del complejo multiproteico de las cohesinas. Estas proteínas son responsables de la cohesión de las cromátidas hermanas desde la replicación del ADN hasta su separación durante la mitosis, y además están implicadas en procesos de reparación de ADN, transcripción y regulación de la arquitectura del núcleo celular. En 2004 se descubrió que las mutaciones germinales en *NIPBL* eran las causantes del síndrome Cornelia de Lange, un raro síndrome autosómico dominante caracterizado por dismorfia facial, alteración del desarrollo mental y físico, con retraso de crecimiento y anomalías en los miembros (focomelia, oligodactilia). Estudios genómicos recientes han documentado una alta frecuencia de mutaciones somáticas en genes que codifican distintas subunidades del complejo de las cohesinas, así como algunas de sus proteínas reguladoras (*NIPBL*, *PDS5B*, *ESPL1*), en diversas patologías neoplásicas, como el glioblastoma multiforme, el sarcoma de Ewing, el carcinoma urotelial, la leucemia mieloide aguda y la leucemia megacarioblástica aguda. Este hallazgo va en consonancia con la conocida implicación de los defectos en la segregación de los cromosomas y la aneuploidía en el proceso de carcinogénesis, aunque los mecanismos genéticos responsables no se conocen en detalle. Consistente con esta hipótesis son los resultados del estudio publicado en 2008 por Barber y colaboradores. En este estudio se identificaron, en un panel de 132 CCR, 11 mutaciones somáticas en 5 genes implicados en la regulación de la cohesión de las cromátidas hermanas, incluidas mutaciones en *NIPBL*, *SMC1A* y *SMC3*. Estos investigadores demuestran, asimismo, que la infra-expresión de estos genes induce inestabilidad cromosómica y defectos en la cohesión de las cromátidas, y sugieren que esto podría ser una de las

principales causas de la inestabilidad cromosómica presente en muchos CCR (Barber, 2008). Dada la implicación de las cohesinas también en los procesos de replicación y reparación del ADN, los tumores con mutaciones en este conjunto de proteínas o sus factores reguladores podrían presentar mayor sensibilidad a la radiación ionizante o al tratamiento con fármacos inductores de daño al ADN. Los resultados de algunos estudios preclínicos avalan esta hipótesis. Así, el silenciamiento de una de las subunidades del complejo de las cohesinas (STAG2) en líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas aumentó notablemente la sensibilidad a distintos compuestos derivados del platino, incluido el cisplatino. De manera similar, líneas celulares de glioblastoma multiforme con mutaciones truncantes de STAG2 eran más sensibles a los inhibidores de PARP (poli ADP-ribosa polimerasa) que las líneas no mutadas, efecto particularmente sinérgico en combinación con temozolamida o camptotecina (Solomon, 2014).

PALM2 pertenece a la familia de las paralemminas, proteínas implicadas en la dinámica de la membrana plasmática y en el control de la forma celular. Estudios preclínicos en líneas celulares y modelos animales de CCR humano han observado una potencial asociación entre la sobre-expresión de *PALM2-AKAP2* y la sensibilidad a MS-275, un inhibidor selectivo de histona deacetilasa (Bracker, 2009). No obstante, la función del producto proteico de *PALM2-AKAP2*, un mRNA naturalmente cotranscrito, aún no ha sido elucidada.

*VSNL1 (visinin-like 1)* es un miembro de la subfamilia visinina/recoverina, pertenecientes a las proteínas sensoras de calcio neuronal. Estas proteínas se expresan principalmente en el sistema nervioso central, y se encargan de la modulación de vías de señalización intracelular mediante la regulación de la actividad de la adenil ciclasa. La sobreexpresión de *VSNL1* incrementa la capacidad

de resistencia a la muerte celular por anoikis de las células tumorales de neuroblastoma, y aumenta su potencial invasor y metastásico (Xie, 2007). Algunos autores sugieren que *VSNL1* puede desempeñar un papel importante en el fenotipo invasivo del cáncer colorrectal, y en la sensibilidad a agentes citotóxicos comúnmente empleados en el tratamiento del CCR (Wu, 2011). De hecho, la sobreexpresión de *VSNL1* se ha asociado con un mayor riesgo de invasión linfática y un peor pronóstico en una serie de pacientes con CCR en estadio inicial (Akagi, 2012). En un estudio publicado por Wu y colaboradores, se demostró una menor expresión de este gen en líneas celulares resistentes a camptotecinas (Wu, 2011).

*WHSC1L1* (*Wolf–Hirschhorn syndrome candidate—like 1*) es un gen que codifica la proteína *WHSC1L1*, una histona-lisina metil-transferasa que desempeña un papel fundamental en la organización de la cromatina. En los últimos años se ha demostrado que estas enzimas son capaces de estimular la proliferación celular y se encuentran implicadas en la carcinogénesis humana, aunque el mecanismo de actuación aún no se ha definido con exactitud (Hamamoto, 2004; Hamamoto, 2006). En un interesante estudio recientemente publicado por Kang y colaboradores, se observó que la proteína *WHSC1L1* se encontraba significativamente sobreexpresada en tumores de vejiga, pulmón, hígado y leucemia mieloide crónica con respecto a la expresión documentada en tejidos sanos. La represión de la expresión de *WHSC1L1* mediante ARN pequeño de interferencia inducía la detención de la proliferación celular en fase G2/M en líneas celulares de cáncer de pulmón y vejiga. Análisis de los perfiles de expresión génica mediante microarrays confirmaron que *WHSC1L1* afectaba la expresión de genes clave en la progresión del ciclo celular en fase de mitosis, como *CCNG1* y *NEK2* (Kang et al, 2013). Teniendo en cuenta que la expresión de *WHSC1L1* es muy baja en tejidos sanos, si estudios futuros

confirman estos datos preliminares, WHSC1L1 podría convertirse en una atractiva diana terapéutica.

Nuestro estudio ha validado, por lo tanto, 7 genes predictivos implicados en rutas moleculares o procesos celulares esenciales, algunos de los cuales desempeñan funciones de potencial relevancia para la citotoxicidad de la QT. La clasificación de riesgo elaborada en función de la expresión tumoral individual de estos 7 genes facilita una nueva herramienta de utilidad clínica, que es capaz de identificar prospectivamente aquellos pacientes con mayor probabilidad de responder a la quimioterapia convencional. Por otro lado permite identificar un subgrupo de pacientes particularmente refractarios a la QT, en los cuales se podría plantear estrategias terapéuticas alternativas experimentales desde primera línea de tratamiento.

Previamente, varios grupos habían conseguido identificar con éxito firmas genéticas capaces de predecir la sensibilidad a fármacos en líneas celulares de CCR (Mariadason et al, 2003; Arango et al, 2004), pero hasta la fecha sólo dos estudios habían evaluado la capacidad de los perfiles de expresión génica para predecir la respuesta a esquemas de poliQT basados en fluoropirimidinas en pacientes diagnosticados de CCRm.

Del Rio y colaboradores publicaron en 2007 una firma de 14 genes predictiva de respuesta a FOLFIRI en una serie de 21 pacientes diagnosticados de CCRm. Los 14 genes del perfil se encontraban sobreexpresados en los pacientes respondedores a la QT (9 pacientes, 43%) comparados con los no respondedores (12 pacientes, 57%). La firma presentó una precisión predictiva global del 95%, al clasificar correctamente a los 9 pacientes respondedores (especificidad del 100%) y a 11 de los 12 no respondedores (sensibilidad del 92%). La clasificación funcional

de los genes mediante *Gene Ontology* reveló la implicación de estos en el *splicing* de ARN (*U2AF1L2*), regulación de la transcripción (*ZNF32* y *ZNF582*), adhesión celular (*F8*, *galectin-8*, *PSG9*), diferenciación celular (*SERPINE2*, *BOLL*), transporte de iones (*ATP50*), transducción de señales (*DRD5*), desarrollo (*ANGPTL2*) y percepción visual (*EML2*). Otros de los genes identificados son de función desconocida, como *GOLGIN-67*, que codifica una proteína de la membrana del aparato de Golgi (Del Rio et al, 2007).

La segunda firma fue publicada por Watanabe et al en 2012. Se trata de un perfil de 27 genes predictivos de respuesta a FOLFOX6 en 40 pacientes con CCRm (*VEPH1*, *SLC4A4*, *HYAL1*, *VNN1*, *ANKRD44*, *PROM2*, *DNER*, *BTG1*, *PFTK1*, *MEG3*, *BST1*, *IL23R*, *RNF180*, *C7orf44*, *GABRR1*, *CYP2C18*, *ALDH3B2*, *HGD*, *CLEC4E*, *RPESP*, *ERAP2*). Catorce de los 40 pacientes (35%) presentaron respuesta a la QT y 26 no respondieron al tratamiento (65%). La firma predijo la respuesta con un 92.5% de precisión. La sensibilidad media fue del 78.6%, con especificidad del 100%, valor predictivo positivo (VPP) del 89.7% y valor predictivo negativo (VPN) del 100%. Al realizar la clasificación funcional de la firma, destacaron 3 categorías que agrupaban a un número considerable de genes: transporte (6 genes), interacción huésped-patógeno (5 genes) y metabolismo de carbohidratos (4 genes).

Como puntos fuertes de estos dos estudios destaca la homogeneidad de la población incluida, tanto en características del tumor como en el tratamiento recibido, así como una elevada precisión en la capacidad predictiva de las firmas genéticas obtenidas. Estos datos indican que son herramientas potencialmente útiles para seleccionar pacientes con elevada probabilidad de respuesta a la QT (FOLFIRI o FOLFOX6). Entre sus limitaciones destaca el pequeño número de



pacientes incluidos y la ausencia de validación de la firma genética en una cohorte independiente de pacientes o mediante una técnica alternativa, lo que resta fiabilidad a los resultados obtenidos y limita su aplicabilidad clínica.

Al comparar los genes identificados en cada una de estas firmas y los genes validados en nuestro estudio, es de destacar la ausencia de solapamiento entre ellos a pesar de que las tres firmas son capaces de predecir respuesta a esquemas de QT que incluyen fluoropirimidinas en una población similar de pacientes. La falta de consistencia entre las firmas puede explicarse, al menos parcialmente, por una serie de razones, entre las que se incluyen la heterogeneidad de las poblaciones incluidas, regímenes de QT recibidos y criterios para la evaluación de respuesta tumoral, diseño de los estudios, tipo de tejido empleado para la realización del microarray y procedimiento de recogida de las muestras, así como los métodos de análisis estadísticos y bioinformáticos.

A pesar de la variabilidad metodológica, las tres firmas identifican de forma constante genes implicados en crecimiento, diferenciación y proliferación celular, adhesión y señalización célula-célula, lo que indica que estas vías desempeñan un papel importante en la respuesta del CCR a la terapia con esquemas basados en fluoropirimidinas. De hecho, es probable que la identificación de vías de señalización en lugar de listados de genes individuales aporte una información más relevante y útil sobre las bases biológicas implicadas en la respuesta tumoral a la QT (Brettingham-Moore, 2011).



# Conclusiones



# Conclusiones

---

1. En pacientes con CCRm, existen patrones de expresión génica capaces de discriminar los tumores sensibles a una QT basada en fluoropirimidinas frente a los refractarios. Los resultados de nuestro trabajo han permitido desarrollar y validar una firma de 7 genes predictiva de la respuesta a la QT en pacientes con CCRm.
2. La firma génica desarrollada permite clasificar de forma prospectiva a los pacientes en dos grupos: a) Firma favorable: pacientes que presentan de 4 a 7 genes con expresión predictiva de respuesta objetiva a la QT, y b) Firma desfavorable: pacientes que presentan de 0 a 3 genes con expresión predictiva de respuesta objetiva a la QT. Los pacientes con firma favorable presentan tasas de respuesta tumoral y supervivencia significativamente superiores a las de pacientes con firma desfavorable.
3. Los siete genes identificados están involucrados en rutas moleculares o procesos celulares esenciales, y algunos de ellos desempeñan funciones de potencial relevancia para la citotoxicidad de la QT: metabolismo de nucleótidos y ácido fólico (*DCK*), unión a chaperonas y regulación de mecanismos celulares de respuesta al estrés (*DNAJC3*), formación de los haces de microtúbulos y control de la migración celular (*NAV1*), mantenimiento de células madre, control de la replicación y reparación del ADN y de la segregación cromosómica (*NIPBL*), control de la dinámica de membrana y de la forma celular (*PALM2*), transporte y unión a iones (*VSNL1*), organización de la cromatina y regulación de la transcripción (*WSHC1L1*).

4. El desarrollo de firmas genéticas predictivas de respuesta como la de este trabajo son de gran trascendencia clínica, ya que permiten evitar a los pacientes con firma desfavorable la toxicidad, el gasto y el tiempo asociado a un tratamiento al cual tienen pocas probabilidades de responder, a la vez que hacen posible plantear precozmente a estos pacientes estrategias terapéuticas alternativas. Por otro lado, la identificación de estos 7 genes predictivos aporta información fundamental acerca de los mecanismos moleculares que determinan y regulan la respuesta a la QT citotóxica estándar en el tratamiento del CCR, y facilita el descubrimiento de nuevas vías de manipulación de la misma que pueden potencialmente optimizar el efecto terapéutico.

# Conclusions

---

1. Gene expression patterns are able to discriminate chemosensitive mCRC tumors versus refractory. Our study developed and validated a 7-gene profile predictive of response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in mCRC patients.
2. Our gene signature prospectively classifies patients in two groups: a) Favorable predictive signature, if they had favorable gene expression levels in at least 4 of the 7 genes in the signature, and b) Unfavorable predictive signature, if they had favorable gene expression levels in  $\leq 3$  of the 7 genes in the signature. Patients with a favorable predictive signature had a significantly greater response rate and survival than patients with an unfavorable predictive signature.
3. Functional classification of these 7 genes revealed their implication in key pathways of CRC biology and/or molecular functions potentially linked to chemotherapy response: nucleotide and folic acid metabolism (*DCK*), chaperone binding and regulation of cellular mechanisms of stress response (*DNAJC3*), microtubule bundle formation and cellular migration control (*NAV1*), stem cell maintenance, DNA replication and repair control and chromosomal segregation (*NIPBL*), regulation of cell shape (*PALM2*), transport and ion binding (*VSNL1*), chromatin organization and regulation of transcription (*WSHC1L1*).
4. Development of predictive signatures shall become invaluable tools to assist clinicians to appropriately select the most effective therapy in each patient, and also provide new clues regarding key molecular pathways involved in drug response, thereby facilitating the development of new approaches to overcome resistance and optimize their therapeutic effect.





# **Bibliografía**



# Bibliografía

---

Abdel-Rahman WM, Peltomäki P. Lynch syndrome and related familial colorectal cancers. *Crit Rev Oncog*. 2008;14:1:22

Akagi T, Hijiya N, Inomata M, Shiraishi N, Moriyama M, Kitano S. Visinin-like protein-1 overexpression is an indicator of lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2012;131(6):1307-1317.

Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(12):6745-50.

Amado RG, Wolf M, Peeters M et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26:1626–1634.

Andersen NN, Jess T. Has the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease decreased? *World J Gastroenterol*. 2013;19(43):7561-8.

Aranda E, Abad A, Carrato A, Cervantes A, García-Foncillas J, García-Alfonso P, García Carbonero R, et al. Treatment recommendations for metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(3):162-178.

Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Arañes MJ, Nicholas C, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2004;91(11):1931-46.

Ashburner M BC, Blake JA, Bostein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*. 2000;25(1):25-29.

Augenlicht LH, Wahrman MZ, Halsey H, Anderson L, Taylor J, Lipkin M. Expression of cloned sequences in biopsies of human colonic tissue and in colonic carcinoma cells induce to differentiate in vitro. *Cancer Res*. 1987, 15;47(22):6017-21.

Augenlicht LH, Taylor J, Anderson L, Lipkin M. Patterns of gene expression that characterize the colonic mucosa in patients at genetic risk for colonic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88:3286-3289.

Barber TD, McManus K, Yuen KW, Reis M, Parmigiani G, Shen D, et al. Chromatid cohesion

defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105:3443-3448.

Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1995;57:289-300.

Bennouna J, Sastre J, Arnold D et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14: 29–37.

Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene.* 2004;23(7):1377-91.

Best L, Simmonds P, Baughan C, Buchanan R, Davis C, Fentiman I, George S, Gosney M, Northover J, Williams C, Collaboration Colorectal Meta-analysis. Palliative chemotherapy for advanced or metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2000, Issue 1. Art. No.: CD001545.

Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Laiho P, Aaltonen LA, et al. Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2002;62(15):4352-63.

Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 663–671.

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003;19(2):185-93.

Booth CM, Eisenhauer EA. Progression-Free Survival: meaningful or simply measurable?. *J Clin Oncol.* 2012;30:1030-1033.

Bosetti C, Rosato V, Gallus S, Cuzick J, La Vecchia C. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011. *Ann Oncol.* 2012; 23: 1403–15.

Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104: 1548–61.

Bracker TU, Sommer A, Fichtner I, Faus H, Haendler B, Hess-Stumpp H. Efficacy of MS-275, a selective inhibitor of class I histone deacetylases, in human colon cancer models. *Int J Oncol.*

2009;35(4):909-920.

Braun MS, Richman SD, Quirke P, et al. Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2008;26:2690-2698.

Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Rickert A, Hoffmeister M. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study. *Ann Intern Med* 2011; 154:22–30.

Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014; 283:1490-502.

Brettingham-Moore KH, Duong CP, Heriot AG, Thomas RJ, Phillips WA. Using gene expression profiling to predict response and prognosis in gastrointestinal cancers-the premise and the perils. *Ann Surg Oncol* 2011;18:1484-1491.

Budinska E, Popovici V, Tejpar S, et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol*. 2013; 231:63-76.

Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(17):1183-92.

Cámara Vicario JC, Romero Laorden N. Epidemiología y nueva estadificación del cancer colorrectal. *Rev Cancer*. 2011;25(1):1-9.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487:330-337.

Capellá G, Blanco I. Susceptibilidad genética al cancer: síndrome de Lynch (cancer colorrectal hereditario no polipósico) y polyposis. En *Biología Molecular del Cáncer: Aproximación a las nuevas terapias*. García-Foncillas, ed. Prous Science, Barcelona, 2009.

Casado-Saenz E, Feliu J, Gomez-España MA, Sanchez-Gastaldo A, Garcia-Carbonero R. SEOM Clinical guidelines for the treatment of advanced colorectal cancer 2013. *Clin Transl Oncol*. 2013;15(12):996-1003.

Cavalieri D, Dolara P, Mini E et al. Analysis of gene expression profile reveals novel correlations with the clinical course of colorectal cancer. *Oncol Res*. 2007;16:535-48.

Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Eng J Med*. 2007;356:2131.

Clarke PA, George ML, Easdale S, Cunningham D, Swift RI, Hill ME, et al. Molecular pharmacology of cancer therapy in human colorectal cancer by gene expression profiling. *Cancer Res.* 2003;63(20):6855-63.

Clark-Langone KM, Sangli C, Krishnakumar J, Watson D. Translating tumor biology into personalized treatment planning: analytical performance characteristics of the Oncotype DX Colon Cancer Assay. *BMC Cancer.* 2010;10:691.

Ciardiello F, Lenz H-J, Köhne C-H et al. Effect of KRAS and NRAS mutational status on first-line treatment with FOLFIRI plus cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): new results from the CRYSTAL trial. *J Clin Oncol.* 2014; 32 (suppl 3; abstr LBA443).

Cole BF, Baron JA, Sandler RS et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2007;297:2351.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(4):337-45.

Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. *Lancet.* 2010; 375:1030-47.

Cunningham D, Lang I, Marcuello E et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14: 1077–1085.

D'Arrigo A, Belluco C, Ambrosi A et al. Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 2005;115:256-62.

De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO CARE-5—a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 23–34.

de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homérin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18(16):2938-47.

De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nature Med.* 2013;19:614-618.

Del Rio M, Molina F, Bascoul-Mollevi C, Copois V, Bibeau F, Chalbos P, et al. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):773-80.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:5705-12.

Dienstmann R, Guinney J, Delorenzi M, De Reynies A, Roepman P, Sadanandam A, et al. Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr 3511)

Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000;355(9209):1041-7.

Douillard JY, Oliner KS, Siena S et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013; 369: 1023–1034.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48:526–535.

Edge S BD, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A: *AJCC Cancer Staging Manual* (ed 7th). New York, Springer, 2010.

Elmunzer BJ, Hayward RA, Schoenfeld PS, Saini SD, Deshpande A, Waljee AK. Effect of flexible sigmoidoscopy-based screening on incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med*. 2012; 9:e1001352.

Fearon, ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6:479-507.

Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet*. 2001;10:721-733.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.

Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF. Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003;129(5):263-71.

Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the BICC-C study. *J Clin Oncol*. 2007;25(30):4779-86.

Garcia-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol*. 2013 Aug;14(9):e358-69.

García-Alfonso P, Salazar R, García-Foncillas J, Musulén E, García-Carbonero R, Payá A, et al; Spanish Society of Medical Oncology (SEOM); Spanish Society of Pathology (SEAP). Guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma (CRC): a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol*. 2012;14(10):726-39.

Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(1):136-47.

Golfinopoulos V, Salanti G, Pavlidis N, Ioannidis JP. Survival and disease-progression benefits with treatment regimens for advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2007 Oct;8(10):898-911.

Gómez-España A, Méndez-Vidal MJ, Aranda E. Cáncer de colon. En: *Tratado de Oncología*. Cortés-Funes H, Colomer Bosch R, ed. Barcelona, Permanyer, 2009.

Gray RG, Quirke P, Handley K, Lopatin M, Magill L, Baehner FL, et al. Validation Study of a Quantitative Multigene Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction Assay for Assessment of Recurrence Risk in Patients With Stage II Colon Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(35):4611-4619.

Grothey A, Sargent D. Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9441-2.

Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013;38:303-12.

Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ *et al*. Revised tumor and node categorization for rectal cancer based on surveillance, epidemiology, and end results and rectal pooled analysis outcomes. *J Clin Oncol*. 2010;28:256-263.



Gunderson LL, Jessup, Sargent DJ et al. Revised TN categorization for colon cancer based on National Survival Outcomes Data. *J Clin Oncol* 2010;28:264-271.

Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res.* 2006;8(3):R25.

Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2004;6:731–740.

Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2006;97:113–118.

Hampel H, Frankel WL, Martin E *et al.* Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:5783-88.

Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1065-1075.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-42.

Hurwitz HI, Tebbutt NC, Kabbinavar F, et al. Efficacy and safety of bevacizumab in metastatic colorectal cancer: pooled analysis from seven randomized controlled trials. *Oncologist.* 2013; 18:1004.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.

Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2040–2048.

Kang D, Cho HS, Toyokawa G, Kogure M, Yamame Y, Iwai Y et al. The Histone Methyltransferase Wolf–Hirschhorn Syndrome Candidate 1-Like 1 (WHSC1L1) Is Involved in Human Carcinogenesis. *Genes, Chromosomes & Cancer.* 2013;52:126-139.

Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P, Davison T, Black JM, Kay EW, et al. Development and Independent Validation of a Prognostic Assay for Stage II Colon Cancer Using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. *J Clin Oncol*. 2011;29(35):4620-4626.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87:159-70.

Kohne CH, van Cutsem E, Wils J, Bokemeyer C, El-Serafi M, Lutz MP, et al; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group. Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):4856-65.

Koopman M, Venderbosch S, van Tinteren H et al. Predictive and prognostic markers for the outcome of chemotherapy in advanced colorectal cancer, a retrospective analysis of the phase III randomized CAIRO study. *Eur J Cancer*. 2009; 45:1999-2006.

Kopetz S, Tabernero J, Rosenberg R, Jiang ZQ, Moreno V, Bachleitner-Hofmann T, et al. Genomic Classifier ColoPrint Predicts Recurrence in Stage II Colorectal Cancer Patients More Accurately Than Clinical Factors. *Oncologist*. 2015 Feb;20(2):127-33.

Kostopoulos I, Karavasilis V, Karina M, et al. Topoisomerase I but not thymidylate synthase is associated with improved outcome in patients with resected colorectal cancer treated with irinotecan containing adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2009;9:339. doi:10.1186/1471-2407-9-339.

Koushik A, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:1471.

Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, Arnold D. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(Suppl 6):vi64-vi72.

Li J, Qin S, Xu R, Yau TC, Ma B, Pan H et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(6):619-29.

Liang J, Jiang T, Yao RY, et al. The combination of ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms

better predicts clinical outcome to oxaliplatin- based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66:493-500.

Lin KJ, Cheung WY, Lai JY, Giovannucci EL. The effect of estrogen vs. combined estrogen-progestogen therapy on the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2012; 130: 419–30.

Logan RF, Grainge MJ, Shepherd VC et al. Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas. *Gastroenterology.* 2008;134:29.

López-Abente G, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, García-Pérez J, Ramis R, Fernández-Navarro P. Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain. *BMC Cancer.* 2014;14:535.

Lurje G, Manegold PC, Ning Y et al. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(5):1000-7.

Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Liu Z, Qin H. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 3775–82.

Maak M, Simon I, Nitsche U, Roepman P, Snel M, Glas AM, et al. Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. *Ann Surg.* 2013;257(6):1053-8.

Maes T, Barceló A, Buesa C. Neuron navigator: a human gene family with homology to unc-53, a cell guidance gene from *Caenorhabditis elegans*. *Genomics.* 2002;80(1):21-30.

Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, et al. Gene Expression Profiling-Based Prediction of Response of Colon Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil and Camptothecin. *Cancer Res.* 2003;63(24):8791-8812.

Marisa L, de Reynies A, Duval A, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: Characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* 2013;10:e1001453.

Maughan TS, Adams RA, Smith CG et al. Addition of cetuximab to oxaliplatinbased first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet.* 2011; 377: 2103–2114.

Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(20):1909-19.

McDermott FT, Hughes ES, Pihl E et al. Prognosis in relation to symptom duration in colon cancer. *Br J Surg*. 1981; 68: 846–849.

Meta-analysis Group in Cancer, Piedbois P, Rougier P, Buyse M, Pignon J, Ryan L, Hansen R et al. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16(1):301-8.

Michels KB, Giovannucci E, Joshipura KJ et al. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1740.

Mitry E, Fields AL, Bleiberg H, Labianca R, Portier G, Tu D et al. Adjuvant chemotherapy after curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008;26(30):4906-11.

Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A, Astolfi A, Formica S, Biasco G. Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: Results and perspectives. *Cancer Treatment Reviews*. 2009;35:201-209.

Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 1208–1215.

O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, Paik S, Clark-Langone KM, Lopatin M, et al. Relationship Between Tumor Gene Expression and Recurrence in Four Independent Studies of Patients With Stage II/III Colon Cancer Treated With Surgery Alone or Surgery Plus Adjuvant Fluorouracil Plus Leucovorin. *J Clin Oncol*. 2010;28(25):3937-3944.

Ogino S and Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2008;10:13-27.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.

Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(23):3726-34.

Palomaki GE, Bradley LA, Douglas MP, et al. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med*. 2009; 11(1): 21- 34.

Peeters M, Price TJ, Cervantes A et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 4706–4713.

Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:1174-79.

Perez-Villamil B, Romera-Lopez A, Hernandez-Prieto S, et al. Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behavior. *BMC Cancer.* 2012;12:260.

Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2004;22:529-536.

Price TJ, Peeters M, Kim TW et al. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 569–579.

Prior I, Lewis PD, Mattos C. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.* 2012;72:2457-2467

Provenzano M, Mocellin S. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Adv Exp Med Biol.* 2007;593:66-73.

Pusztai L, Ayers M, Stec J, Hortobagyi GN. Clinical application of cDNA microarrays in oncology. *The Oncologist.* 2003,8:252-58.

Roepman P, Schlicker A, Tabernero J, et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer.* 2014;134: 552-562.

Ross JS, Torres-Mora J, Wagle N, Jennings TA, Jones DM. Biomarker-based prediction of response to therapy for colorectal cancer. *Am J Clin Pathol.* 2010;134(3):478-490.

Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK, et al. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol.* 2003;21(11):2059-69

Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials.

Lancet. 2011; 377: 31–41.

Saad ED, Katz A, Hoff PM, Buyse M. Progression-free survival as surrogate and as true endpoint: insights from the breast and colorectal cancer literature. *Ann Oncol.* 2010;21(1):7-12.

Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschlegel S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med.* 2013;19(5):619-25.

Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene Expression Signature to Improve Prognosis Prediction of Stage II and III Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(1):17-24.

Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(4):1322-7.

Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med.* 2000;343(13):905-14.

Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2013–2019.

Schlicker A, Beran G, Chresta CM, et al. Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Medical Genomics.* 2012;5:66.

Schmoll HJ et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012 Oct;23(10):2479-516.

Seymour MT, Brown SR, Middleton G et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14: 749–759.

Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA.* 1999;282-1254.

Shimizu D, Ishikawa T, Ichikawa Y, et al. Prediction of chemosensitivity of colorectal

cancer to 5-fluorouracil by gene expression profiling with cDNA microarrays. *Int J Oncol.* 2005;27:371-6.

Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology.* 2015;148(1):88-99.

Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2311–2319.

Solomon DA, Kim JS, Waldman T. Cohesin gene mutations in tumorigenesis: from discovery to clinical significance. *BMB Rep.* 2014;47(6):299-310.

Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T et al. Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8465.

Staunton JE, Slonim DK, Collier HA et al. Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:10787-92.

Stintzig S, Jung A, Rossius L et al. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in FIRE-3: a randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. *Eur J Cancer.* 2013; 49 (Suppl 3; LBA 17).

Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M et al. PEAK: A randomized, multicenter phase ii study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2014; 32: 2240–2247.

Synofzik M, Haack TB, Kopajtich R, Gorza M, Rapaport D, Greiner M et al. Absence of BiP co-chaperone DNAJC3 causes diabetes mellitus and multisystemic neurodegeneration. *Am J Hum Genet.* 2014; 95(6):689-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.10.013.

Taberero J, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, Ciuleanu TE et al. RAISE: A randomized, double-blind, multicenter phase III study of irinotecan, folinic acid, and 5-fluorouracil (FOLFIRI) plus ramucirumab (RAM) or placebo (PBO) in patients (pts) with metastatic colorectal carcinoma (CRC) progressive during or following first-line combination therapy with bevacizumab (bev), oxaliplatin (ox), and a fluoropyrimidine (fp). *J Clin Oncol.* 33, 2015 (suppl 3; abstr

512).

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(3):205-216.

Thirion P, Michiels S, Pignon JP, Buyse M, Braud AC, Carlson RW, et al; Meta-Analysis Group in Cancer. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2004;22(18):3766-75.

Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229-37.

Tveit KM, Guren T, Glimelius B et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 1755–1762.

Van Cutsem E, Hoff PM, Harper P, Bukowski RM, Cunningham D, Dufour P, et al. Oral capecitabine vs intravenous 5-fluorouracil and leucovorin: integrated efficacy data and novel analyses from two large, randomised, phase III trials. *Br J Cancer.* 2004 Mar 22;90(6):1190-7.

Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(13):1658-64.

Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009; 360: 1408–1417.

Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 2011–2019.

Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin based regimen. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3499–3506.

Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.



Ann Oncol 2014; 25 Suppl3:iii1-9.

Van Cutsem E, Ohtsu A, Falcone A, et al. Phase III RECURSE trial of TAS-102 vs placebo, with best supportive care, in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) refractory to standard therapies (abstract LBA13). Data presented at the 2014 ESMO Congress, September 27, 2014, Madrid, Spain. Abstract available online at <https://www.webges.com/cslide/library/esmo/browse/search/gow#9f8U02vN> (Accessed on December 04, 2014).

Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(7):692-700.

van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(25):1999-2009.

van der Wilt CL, Kroep JR, Loves WJ, Rots MG, Van Groeningen CJ, Kaspers GJ, Peters GJ. Expression of deoxycytidine kinase in leukaemic cells compared with solid tumour cell lines, liver metastases and normal liver. *Eur J Cancer*. 2003;39(5):691-697.

Van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer*. 2004;40:939-950.

van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415:530-6.

van't Veer LJ, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature*. 2008;452:564-570.

Venook AP, Niedwiecki D, Lopatin M, Ye X, Lee M, Friedman PN et al. Biologic Determinants of Tumor Recurrence in Stage II Colon Cancer: Validation Study of the 12-Gene Recurrence Score in Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 9581. *J Clin Oncol*. 2013; 31(14):1775-1781.

Venook A, Niedzwiecki D, Lenz H, Innocenti F, Mahony MR et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-fu/leucovorin (MFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (PTS) with expanded ras analyses untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC). *Ann Oncol*. 2014;25(Suppl 2):ii105-ii117.

Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Eng J Med*. 2006; 354:684.

Wagner AD, Arnold D, Grothey AA, Haerting J, Unverzagt S. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 Jul 8;(3):CD005392.

Wang Y, Jatkoe T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, et al. Gene Expression Profiles and Molecular Markers To Predict Recurrence of Dukes' B Colon Cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:1564-1571.

Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K et al. Gene expression signature and response to the use of leucovorin, fluorouracil and oxaliplatin in colorectal cancer patients. *Clin Transl Oncol.* 2011;13(6):419-25.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007;318:1108-13.

Wu XM, Shao XQ, Meng XX, Zhang XN, Zhu L, Liu SX, et al. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in hydroxycamptothecin resistant gastric cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(2):259-69.

Yamasaki M, Takemasa I, Komori T et al. The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2007;30:129-38.

Yin M, Yan J, Martinez-Balibrea E, Graziano F, et al. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(6):1632-40.

Yoshino T, Mizunuma N, Yamazaki K, Nishina T, Komatsu Y, Baba H, et al. TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(10):993-1001.

Yothers G, O'Connell MJ, Lee M, Lopatin M, Clark-Langone KM, Millward C et al. Validation of the 12-Gene Colon Cancer Recurrence Score in NSABP C-07 As a Predictor of Recurrence in Patients With Stage II and III Colon Cancer Treated With Fluorouracil and Leucovorin (FU/LV) and FU/LV Plus Oxaliplatin. *J Clin Oncol.* 2013;31:1-11.

Xie Y, Chan H, Fan J, Chen Y, Young J, Li W, et al. Involvement of visinin-like protein-1 (VSNL-1) in regulating proliferative and invasive properties of neuroblastoma. *Carcinogenesis.* 2007;28(10):2122-30.

Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, et al. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene*. 2002;21(31):4855-62.



**Anexo:**  
**Publicaciones**



# Anexo 1: Publicaciones

---

1) PDGFR  $\alpha/\beta$  and VEGFR2 polymorphisms in colorectal cancer: incidence and implications in clinical outcome. **Estevez-Garcia P**, Castaño A, Martin AC, Lopez-Rios F, Iglesias J, Muñoz-Galván S, Lopez-Calderero I, Molina-Pinelo S, Pastor MD, Carnero A, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R. BMC Cancer. 2012 Nov 12;12:514. Factor de impacto: 3.591. **Q2**

2) Spinophilin loss correlates with poor patient prognosis in advanced stages of colon carcinoma. **Estevez-Garcia P**, Lopez-Calderero I, Molina-Pinelo S, Muñoz-Galvan S, Salinas A, Gomez-Izquierdo L, Lucena-Cacace A, Felipe-Abrio B, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R, Carnero A. Clin Cancer Res. 2013 Jul 15;19(14):3925-35. Factor de impacto: 7.837. **Q1 D1**

3) MiR-107 and miR-99a-3p predict chemotherapy response in patients with advanced colorectal cancer. Molina-Pinelo S, Carnero A, Rivera F, **Estevez-Garcia P**, Bozada JM, Limon ML, Benavent M, Gomez J, Pastor MD, Chaves M, Suarez R, Paz-Ares L, de la Portilla F, Carranza-Carranza A, Sevilla I, Vicioso L, Garcia-Carbonero R. BMC Cancer. 2014 Sep 7;14:656. Factor de impacto: 3.32. **Q2**

4) Gene expression profile predictive of response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer. **Estevez-Garcia P**, Rivera F, Molina-Pinelo S, Benavent M, Gómez J, Limón ML, Pastor MD, Martinez-Perez J, Paz-Ares L, Carnero A, Garcia-Carbonero R. Oncotarget. 2015 Mar 20;6(8):6151-

9. Factor de impacto: 6.636. **Q1 D1**



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# PDGFR $\alpha$ / $\beta$ and VEGFR2 polymorphisms in colorectal cancer: incidence and implications in clinical outcome

Purificacion Estevez-García<sup>1,2</sup>, Angel Castaño<sup>3</sup>, Ana C Martin<sup>4</sup>, Fernando Lopez-Rios<sup>5</sup>, Joaquin Iglesias<sup>4</sup>, Sandra Muñoz-Galván<sup>1</sup>, Iker Lopez-Calderero<sup>1,2</sup>, Sonia Molina-Pinelo<sup>1</sup>, Maria D Pastor<sup>1</sup>, Amancio Carnero<sup>1</sup>, Luis Paz-Ares<sup>1,2</sup> and Rocio Garcia-Carbonero<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Angiogenesis plays an essential role in tumor growth and metastasis, and is a major target in cancer therapy. VEGFR and PDGFR are key players involved in this process. The purpose of this study was to assess the incidence of genetic variants in these receptors and its potential clinical implications in colorectal cancer (CRC).

**Methods:** VEGFR2, PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$  mutations were evaluated by sequencing their tyrosine kinase domains in 8 CRC cell lines and in 92 samples of patients with CRC. Correlations with clinicopathological features and survival were analyzed.

**Results:** Four SNPs were identified, three in PDGFR $\alpha$  [exon 12 (A12): c.1701A>G; exon 13 (A13): c.1809G>A; and exon 17 (A17): c.2439+58C>A] and one in PDGFR $\beta$  [exon 19 (B19): c.2601A>G]. SNP B19, identified in 58% of tumor samples and in 4 cell lines (LS174T, LS180, SW48, COLO205), was associated with higher PDGFR and pPDGFR protein levels. Consistent with this observation, 5-year survival was greater for patients with PDGFR B19 wild type tumors (AA) than for those harboring the G-allele genotype (GA or GG) (51% vs 17%;  $p=0.073$ ). Multivariate analysis confirmed SNP B19 ( $p=0.029$ ) was a significant prognostic factor for survival, independent of age ( $p=0.060$ ) or TNM stage ( $p<0.001$ ).

**Conclusions:** PDGFR $\beta$  exon 19 c.2601A>G SNP is commonly encountered in CRC patients and is associated with increased pathway activation and poorer survival. Implications regarding its potential influence in response to PDGFR-targeted agents remain to be elucidated.

**Keywords:** VEGFR, PDGFR, SNP, Colorectal cancer, Angiogenesis, Prognosis

## Background

Colorectal cancer (CRC) is the third most common tumour in the world, with over 1.2 million new cases diagnosed every year, and is responsible for about 8% of cancer related deaths [1]. Approximately one third of patients present metastatic disease at diagnosis, and about 40% of those with early-stage tumors will eventually relapse at some point over the course of the disease [2,3]. Although prognosis has greatly improved over the

past decades due to significant surgical and medical advances, once the tumor has progressed beyond surgical resectability, the disease is essentially incurable and median survival ranges from 14 to 24 months with best available systemic therapy [4]. Development of new more effective agents is thus actively pursued.

Angiogenesis has become a major target in colorectal cancer therapy. Bevacizumab, a humanized monoclonal antibody against the vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), was the first antiangiogenic agent to demonstrate efficacy in CRC. In the pivotal study by Hurwitz et al., the addition of this agent to irinotecan-based combination cytotoxic therapy significantly improved survival compared to irinotecan-based chemotherapy alone

\* Correspondence: rgcarbonero@hotmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) (HUVR, CSIC, Universidad de Sevilla), Sevilla, Spain

<sup>2</sup>Medical Oncology Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

in patients with advanced CRC [5]. Subsequently, bevacizumab has been tested in combination with other chemotherapy regimens with more modest results [3,4]. More recently, a benefit in survival has been also reported in patients with advanced CRC with two new promising antiangiogenic drugs: aflibercept (a VEGF trap) in combination with FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) following progression to oxaliplatin-based therapy [6], and regorafenib (a novel tyrosine kinase inhibitor targeting VEGFR, PDGFR, FGFR, RET, KIT and TIE2) as single-agent therapy in patients who had progressed to all standard therapies [7]. These results clearly illustrate angiogenesis inhibition is to play a major role in the management of this disease.

Angiogenesis is a highly controlled process under physiological conditions, such as embryonal development, postnatal growth and wound healing, but is also a critical driver of tumor growth and progression [8]. It is tightly regulated by a complex equilibrium among different pro- and antiangiogenic factors secreted both by tumor cells and by cells of the tumor microenvironment (pericytes, endothelial, mesenchymal or immune cells). VEGF and their receptors represent one of the best validated pathways involved in angiogenesis [9,10]. VEGF stimulates both proliferation and migration of endothelial cells, enhances microvascular permeability, and is essential for revascularization during tumor formation. It is commonly over-expressed in human tumors, and this is often associated with increased vascular density and more aggressive clinical behavior. VEGF-A and its main receptor, VEGFR2/KDR, are key members of this family and common targets of antiangiogenic agents [11,12].

Platelet-derived growth factor (PDGF) and their receptors (PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$  and PDGFR- $\alpha\beta$ ) play also a critical role in angiogenesis regulation by exerting important control functions in mesenchymal cells during development [13]. PDGF is expressed by endothelial cells and acts in a paracrine manner by recruiting PDGFR-expressing cells, such as pericytes and smooth muscle cells, to the developing vessels, thus improving pericyte coverage and vessel function. PDGF signaling promotes cell migration, survival and proliferation and indirectly regulates angiogenesis by inducing VEGF transcription and secretion [10,13,14]. Mutations involving up-regulation of PDGF and/or PDGFR, as well as PDGFR-dependent growth stimulation, have been documented in a number of solid tumors and hematological malignancies, suggesting a likely role of this pathway in carcinogenesis [10,15]. Moreover, agents antagonizing PDGFR-mediated signaling have also demonstrated antineoplastic activity in preclinical models and in clinical trials, including some conducted in patients with CRC (i.e. regorafenib) [7]. Nevertheless, several other drugs also targeting these pathways (i.e. sunitinib,

sorafenib) [16,17] have failed to prove a significant positive impact on the outcome of patients with CRC. The biological grounds for these discordant results are not well understood.

Therefore, and in spite of their undeniable success, only a small proportion of patients do actually benefit from antiangiogenic agents, and reliable tools to prospectively identify which patients are more likely to benefit are scarce. In this scenario, efforts to unravel the intricate molecular pathways governing tumor angiogenesis are certainly needed for progress to be made. In the present study, we sought to evaluate the incidence of genetic polymorphisms of some of the key players of angiogenesis, such as VEGFR-2, PDGFR- $\alpha$  and PDGFR- $\beta$ , and their potential influence in CRC biology. With this purpose we sequenced the tyrosine kinase domains of these receptors in 8 CRC cell lines (T84, LOVO, LS174T, HT29, LS180, SW48, SW480, COLO205) and in 92 tumor samples of patients with colorectal adenocarcinoma. Correlations of encountered genetic variables with protein expression in cell lines, as well as with clinicopathological features and survival of these patients were also analyzed to assess their potential biological and clinical implications.

## Methods

### Laboratory procedures

#### CRC cell lines

Eight human CRC cell lines (T84, LOVO, LS174T, HT 29, LS180, SW48, SW480 and COLO205) were selected and purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC). They were representative of patients with different gender, age and tumor stage.

#### Cell culture

Each cell line was grown in conditions of temperature, humidity, O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> levels, culture medium and supplements according to providers' instructions. Once they reached confluence in monolayer DNA extraction was performed. The total DNA yield was determined using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Tech, DE, USA).

#### DNA isolation from human tumor samples and culture cells

Formalin-fixed paraffin-embedded tissues from the 92 selected CRC patients were provided by the Pathology Departments of the corresponding institutions. Samples were mainly obtained from the primary tumor (96%), either by surgical (87%) or endoscopic procedures. Three tissue sections of each tumor were first deparaffinized and rehydrated by serial passes in D-Limoneno (Histo-Clear<sup>®</sup>, National Diagnostic, Atlanta, GA, USA) and ethanol (100%). Then, DNA isolation from both human tumor tissue samples and culture cells

was performed with the REAL pure genomic DNA extraction kit (Durviz, Valencia, Spain) according to the manufacturer's instructions and then purified using ion exchange columns (QIAGEN Miniprep kit Cat. No. 27106). The total DNA yield was determined using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Tech, DE, USA).

### Genotyping

Public databases including National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>) and Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) were reviewed to obtain the haplotypes of the three genes of interest and their reported genetic variants. The exomic regions corresponding to the tyrosine kinase domains, which were the regions with the highest probability of mutations, were then identified for each gene: exons 17 to 26 for VEGFR2, and exons 12 to 21 for PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$ . Specific primers were designed to amplify these exons using expert software in order to minimize non-specific or erroneous amplifications and improve outcomes. Primers used in this study are described in Additional file 1: Table S1. Amplification of the tyrosine kinase domains in both CRC cell lines and tissue samples was performed by a polymerase chain reaction (PCR) method. Fifty nanograms of the genomic purified DNA were amplified in a PCR reaction containing 1.5 units of DNA polymerase EuroTAQ (Genycell Biotech Spain SL; Santa Fe, Granada, Spain), 1xEuroTaq buffer, 2.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0.4  $\mu$ M forward and reverse primers, 80  $\mu$ M dNTPs (20  $\mu$ M each one), 1% DMSO and 1M betaine in a volume of 50  $\mu$ l. The PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 5 minutes, 5 cycles at 94°C for 1 minute, and annealing that began at 67°C for 45 seconds; this temperature was decreased 2°C each cycle to 59°C (67, 65, 63, 61, 59) and then 45 seconds at 72°C. This was followed by 35 cycles at 95°C 1 minute, 55°C for 45 seconds and 72°C for 45 seconds. The last step was a final extension cycle at 72°C for 10 minutes.

### DNA sequencing

PCR products were first purified using the microClean kit (Microzone Ltd.; Haywards Heath, UK) or ExoSAP-IT<sup>®</sup> for PCR Product Clean-Up USB (Affimetrix Inc; Santa Clara, CA, USA) for individual reactions or PERFORMA<sup>®</sup> DTV V396-Well Short Plates (Genycell Biotech Spain SL; Santa Fe, Granada, Spain) for 96 plate reactions. Direct bidirectional sequencing of the PCR products was done using BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA) and ABI 3110 Genetic Analyser (Applied

Biosystems) according to the manufacturer's instructions. All fragments were double-strand sequenced a number of times, and genetic variations found were checked twice. Sequencing analysis was performed using Chromas Lite, Clustal W and DiAlign software.

### Analysis of protein expression

Cells were washed twice in 1 $\times$  PBS, pelleted for 30 seconds at 14000 $\times$  g and lysed in lysis buffer (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, NP40 1%, glycerol 10%, NaCl 150mM, complete protease inhibitor cocktail, 2 mM; Roche). After centrifugation, supernatant protein extracts were aliquoted and stored at -80°C until use. The amount of protein was determined by Bradford assay using BSA (bovine serum albumin) as a standard. The appropriate protein quantity was dissolved in Laemli buffer (Tris-HCl pH 6.8 62.5mM, glycerol 10%, SDS 1%, 2-mercapto ethanol 5%, bromphenol blue 0.0025%) and the proteins were separated in SDS-PAGE gels (12%) before they were blotted onto Nitrocellulose Transfer membrane (Whatman - Protrans). Primary antibodies employed were: p-PDGFR- $\beta$  (Tyr1021)-R 1:400 (Santa Cruz#sc-12909-R), PDGFR- $\beta$  1:500 (Santa Cruz#sc-339), tubulin 1:10000 (Sigma - T6557). The secondary antibodies used were goat anti-rabbit Alexa Fluor 680 1:5000 (Invitrogen - A21057) and donkey anti-mouse IRDye 800CW 1:5000 (Rockland Inc. - 605-731-002).

### CRC study population, tumor samples and data collection

Patients that met the following inclusion criteria were selected for the present study: (1) histologically confirmed diagnosis of primary CRC; (2) adequate clinical data recorded in medical charts; (3) adequate tissue specimen available for additional molecular assays (a proportion of tumor cells > 50% was required). Cases were reviewed according to a previously designed protocol which included the following clinical data: age, sex, date of diagnosis, baseline carcinoembryonic antigen (CEA) plasma levels, primary tumor location, TNM stage [18], histological type, tumor differentiation, surgical treatment (type and outcome of surgery), chemotherapy (adjuvant or for advanced disease, regimen used), radiotherapy (neoadjuvant, adjuvant or palliative), date of last visit or death and cause of death. The study protocol was approved by the institutional review boards of participating centers.

Main characteristics of the 92 included patients are summarized in Table 1 and are representative of a standard CRC population. The median age was 68 years, 63% were male and 40% presented advanced disease at diagnosis. The great majority had conventional adenocarcinomas (86%) and only 13% were poorly differentiated tumors. Cancer specific therapy is outlined in Additional file 1: Table S2. Patients with early stage disease (I-III)

**Table 1 Population and tumor samples characteristics**

	N (%)
Age (years)	
• Median (range)	68 (45–87)
Gender	
• Female	34 (37.0%)
• Male	58 (63.0%)
Primary tumor location	
• Right colon	27 (29.3%)
• Transverse colon	5 (5.4%)
• Left colon	9 (9.8%)
• Sigmoid colon	18 (19.6%)
• Recto sigmoid colon	14 (15.2%)
• Rectum	19 (20.7%)
Histology	
• Conventional adenocarcinoma	79 (85.9%)
• Mucinous or colloid adenocarcinoma	12 (13.0%)
• Signet ring cell adenocarcinoma	1 (1.1%)
Tumor differentiation	
• Well differentiated	22 (23.9%)
• Moderately differentiated	46 (50.0%)
• Poorly differentiated	12 (13.0%)
TNM stage	
• I	8 (8.7%)
• II	22 (23.9%)
• III	24 (26.1%)
• IV	37 (40.2%)
• Unknown	1 (1.1%)
Baseline CEA (ng/mL)	
• High	33 (35.9%)
• Normal	59 (64.1%)
• Median (range)	3 (0–13.318)

TNM: Tumor, Node and Metastases; CEA: carcinoembryonic antigen.

underwent primary tumor surgery with curative intent. Adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy with or without oxaliplatin was indicated in patients with high risk stage II or stage III CRC following surgical resection. Neoadjuvant or adjuvant radiotherapy was added in stage II-III patients with rectum primaries. Patients with advanced stage IV disease were managed primarily with systemic chemotherapy that included oxaliplatin- (44%) or irinotecan-based (13%) combination regimens or fluoropyrimidines alone (3%). With a median follow-up of 31 months (range: 8 to 99 months), 59 patients (64%) had died due to disease progression or to complications of cancer therapy.

#### Statistical analysis

A minimum sample size of 80 patients was planned to be screened in case no mutations were to be encountered, as

in such a case the probability of finding mutations in the general population was estimated to be very low ( $\leq 4.4\%$ ;  $\alpha=0.05$ ,  $\beta=0.80$ ) and therefore non-clinically relevant. Considering an expected drop-out rate of about 10% (technical issues or others), 92 patients were finally selected for study entry. Descriptive statistics were used to characterize the most relevant clinical parameters. The association of categorical clinical or pathological features and mutation type was explored by the chi-squared test or Fisher's exact test when appropriate. Overall survival (OS) was calculated from the time of histological diagnosis to the date of death (deaths due to surgical complications were censored). The Kaplan-Meier product limit method [19] was used to estimate OS, and differences observed among patient subgroups were assessed by the log rank test [20]. Multivariate analysis using the Cox proportional hazards model [21] was performed to assess the association between mutations and clinical outcome while adjusting for other potential confounding factors such as age, tumor stage, primary tumor location, CEA levels and tumor differentiation.  $P < 0.05$  was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 16.0 for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL).

#### Results

##### Characterization of VEGFR2, PDGFR $\alpha$ and PDGFR $\beta$ genetic variants

Three genetic variations were identified in PDGFR $\alpha$  (exons 12, 13 and 17) and one in PDGFR $\beta$  (exon 19) with respect to the registered wild type (WT) reference sequence (NM006206 and NM002609, respectively), whereas no VEGFR2 mutations were detected. Those encountered in exons A12, A13 and B19 were silent mutations showing nucleotide substitution in the third base of the codon without modifying the codified amino acid, while the one detected in A17 was an intronic insertion. All of them corresponded to single nucleotide polymorphisms (SNP) previously described in public databases with reference SNP IDs rs1873778, rs10028020, rs246395 and rs2412559, respectively (Additional file 1: Table S3).

##### SNPs identified in CRC cell lines

Both SNP A12 and SNP A17 were found in homozygosis in all CRC cell lines. PDGFR-A13 SNP was present in heterozygosis in two cell lines (LS174T and LS180), and PDGFR-B19 presented a SNP in heterozygosis in four of them (LS174T, LS180, SW48 and SW480).

##### SNPs identified in CRC patient tumor samples

PDGFR-A12 and PDGFR-A17 analysis was feasible in all tumor samples, and all of them showed the SNPs variants in homozygosis. PDGFR-A13 was successfully

analyzed in 73 cases (79%), being the SNP A13 detected in heterozygosis in 18% of analyzed samples (13 patients). PDGFR-B19 complete analysis was achieved in 78 patients (85%), and the SNP B19 was found in 58% of evaluable samples (45 patients), both in homo- and heterozygosis (7 and 38 patients, respectively). Figure 1 illustrates DNA sequencing of PDGFR $\alpha$  exon 12 and PDGFR $\beta$  exon 19, showing SNPs identified in our population.

#### Correlation of PDGFR $\alpha$ and PDGFR $\beta$ genetic variants and clinicopathological features

Distribution of SNPs A13 and B19 according to gender, age, baseline CEA levels, primary tumor location, histological type, TNM stage at diagnosis and tumor differentiation is described in Table 2. The only observed correlations that were of borderline statistical significance were those found between SNP B19 and primary tumor location, and SNP A13 and tumor differentiation. Indeed, the PDGFR B19 SNP was more commonly encountered among patients with colon primaries than in those with primary tumors located in the rectum (63.9% vs 35.3%;  $p=0.051$ ). On the other hand, PDGFR SNP A13 was never detected in well differentiated tumors, whereas it was identified in 23% of moderately or poorly differentiated ones ( $p=0.053$ ).

#### PDGFR $\alpha$ and PDGFR $\beta$ genetic variants and colon cancer survival

Overall survival of patients according to PDGFR-A13 and -B19 SNPs identified is depicted in Table 3. No significant impact in overall survival was observed for

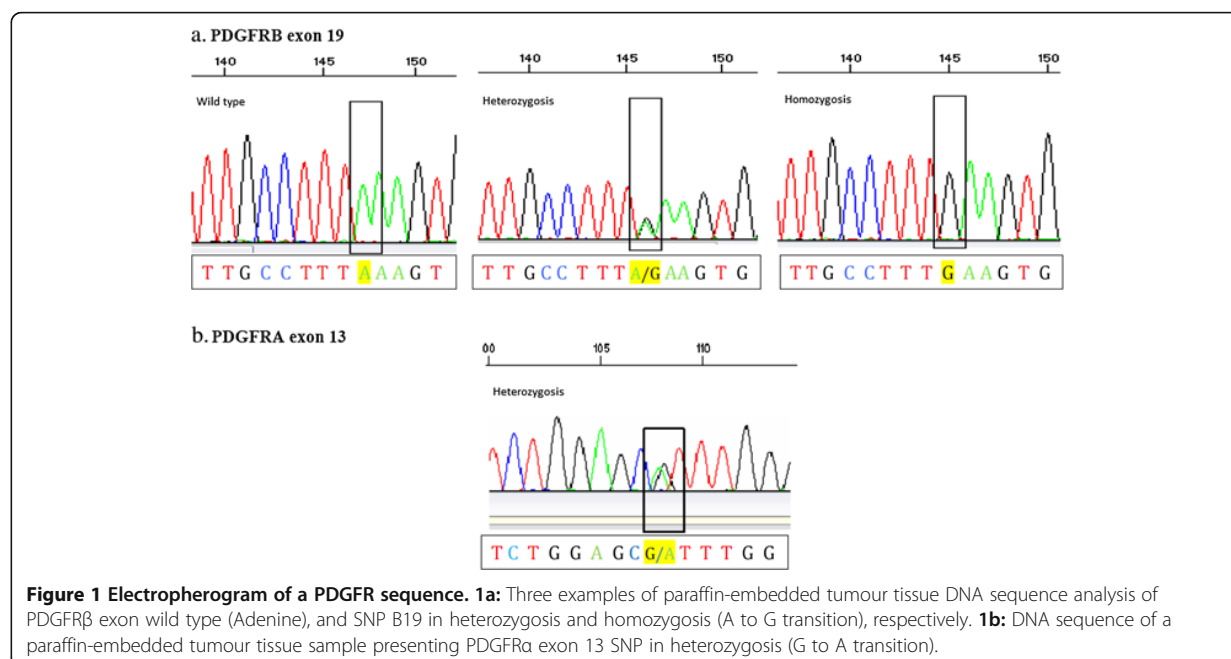
SNP A13. On the contrary, 5-year survival of patients PDGFR-B19 WT was substantially greater than that observed in those harboring the SNP (51% vs 17%;  $p=0.073$ ) (Figure 2). Multivariate analyses showed the presence of the B19 SNP variant was a significant independent predictor of survival (HR 2.89,  $p=0.029$ ). Other variable that retained independent prognostic value in the Cox regression model was TNM stage ( $p<0.001$ ), and age was of borderline significance ( $p=0.060$ ) (Additional file 1: Table S4).

#### Effect of B19 SNP in PDGF receptor levels

To explore the potential biological relevance of the identified PDGFR-B19 SNP, we assessed PDGFR $\beta$  protein levels in each cell line and correlated them with whether or not they harbored the SNP of interest. Of note, the cell lines that contained the B19 SNP in heterozygosis (LS174T, LS180, SW48 and Colo205) showed higher levels of PDGFR $\beta$  protein than those harboring only the wild type allele (Figure 3). In addition, these higher levels of receptor were associated with higher levels of Tyr1021-phosphorylated receptor (Figure 3), indicating its constitutive activation and increased signaling of the pathway.

#### Discussion

The present study evaluated the incidence of VEGFR2, PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$  TK domain genetic variants in different CRC cell lines (T84, LOVO, LS174T, HT29, LS180, SW48, SW480, COLO205) and in tumor samples of 92 patients diagnosed of colorectal adenocarcinoma.



**Figure 1** Electropherogram of a PDGFR sequence. **1a:** Three examples of paraffin-embedded tumour tissue DNA sequence analysis of PDGFR $\beta$  exon wild type (Adenine), and SNP B19 in heterozygosis and homozygosis (A to G transition), respectively. **1b:** DNA sequence of a paraffin-embedded tumour tissue sample presenting PDGFR $\alpha$  exon 13 SNP in heterozygosis (G to A transition).



**Table 2 Correlation of PDGFR A13 and B19 mutational status and clinical-pathological features**

Clinical features	PDGFR $\alpha$ exon 13			PDGFR $\beta$ exon 19		
	WT N (%)	SNP N (%)	p	WT N (%)	SNP N (%)	p
Gender			0.754			0.346
• Female	24 (85.7)	4 (14.3)		10 (34.5)	19 (65.5)	
• Male	36 (80.0)	9 (20.0)		23 (46.9)	26 (53.1)	
Age			0.127			0.653
• $\leq$ 68-years old (median)	34 (89.5)	4 (10.5)		18 (45.0)	22 (55.0)	
• > 68-years old (median)	26 (74.3)	9 (25.7)		15 (39.5)	23 (60.5)	
CEA (carcinoembryonic antigen)			1.000			0.813
• Within normal range	39 (83.0)	8 (17.0)		21 (41.2)	30 (58.8)	
• $\geq$ ULN (5 ng/ml)	21 (80.8)	5 (19.2)		12 (44.4)	15 (55.6)	
Primary tumour location			1.000			<b>0.051</b>
• Colon	47 (82.5)	10 (17.5)		22 (36.1)	39 (63.9)	
Rectum	13 (81.3)	3 (18.8)		11 (64.7)	6 (35.3)	
Tumour histology			0.401			0.221
• Conventional adenocarcinoma	52 (83.9)	10 (16.1)		30 (45.5)	36 (54.5)	
• Mucinous or colloid adenocarcinoma	8 (72.7)	3 (27.3)		3 (25.0)	9 (75.0)	
TNM stage			0.196			0.170
• I-II	23 (92.0)	2 (8.0)		8 (30.8)	18 (69.2)	
• III-IV	37 (78.7)	10 (21.3)		24 (47.1)	27 (52.9)	
Tumour differentiation			<b>0.053</b>			0.586
• Well differentiated	15 (100)	0 (0.0)		7 (36.8)	12 (63.3)	
• Moderately or poorly differentiated	37 (77.1)	11 (22.9)		23 (47.9)	25 (52.1)	
Surgery of primary tumor			0.578			0.389
• Yes	55 (80.9)	13 (19.1)		32 (43.8)	41 (56.2)	
• No	5 (100.0)	0 (0.0)		1 (20.0)	4 (80.0)	
Surgery of metastasis			0.953			0.451
• Yes	13 (86.7)	2 (13.3)		9 (50.0)	9 (50.0)	
• No	47 (81.0)	11 (19.0)		24 (40.0)	24 (40.0)	
Adjuvant chemotherapy			0.295			0.986
• Yes	28 (87.5)	4 (12.5)		14 (42.4)	19 (57.6)	
• No	32 (78.0)	9 (22.0)		19 (42.2)	26 (57.8)	
Chemotherapy for advanced disease			0.683			0.929
• Yes	36 (83.7)	7 (16.3)		18 (41.9)	25 (58.1)	
• No	24 (80.0)	6 (20.0)		15 (42.9)	20 (57.1)	

Four SNPs were identified, three in PDGFR $\alpha$  [exon 12 (A12): c.1701A>G, rs1873778; exon 13 (A13): c.1809G>A, rs10028020; and exon 17 (A17): c.2439+58C>A, rs2412559] and one in PDGFR $\beta$  [exon 19 (B19): c.2601A>G, rs246395]. SNP B19, present in 4 CRC cell lines (LS174T, LS180, SW48, COLO205) and in 58% of patients, had a substantial impact on overall survival, with 5-year survival rates of 51% for patients with PDGFR B19 wild type tumors versus 17% for those harboring the SNP variant (c.2601A>G). This is the first study to analyze the PDGFR genotype in a series of human colorectal cancer and its correlation with different

clinicopathological features, and to demonstrate a significant association of a PDGFR SNP with patients' outcome.

Angiogenesis is a complex process controlled by a number of interconnected signaling pathways, among which PDGF and their receptors play a critical role. Moreover, PDGFR has been the target for many newly developed anticancer drugs, some of them with proven efficacy in CRC (i.e. regorafenib) [7] and some that have failed to demonstrate a benefit in patients with this tumor type (i.e. sunitinib, sorafenib) [16,17]. Despite this, however, only few studies have analyzed the clinical implications of PDGF/PDGFR expression in colorectal

**Table 3 Overall survival according to PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$  mutational status**

Mutational status	Patients N (%)	Overall survival			
		Median (months)	% at 5y	HR	P
<b>PDGFR-A13</b>					
• WT (AA)	60 (82%)	37.1	14%	0.96	0.934
• SNP (AG)	13 (18%)	21.7	41%		
<b>PDGFR-B19</b>					
• WT (AA)	33 (42%)	NR	51%	1.93	0.073
• SNP (AG,GG)	45 (58%)	37.1	17%		

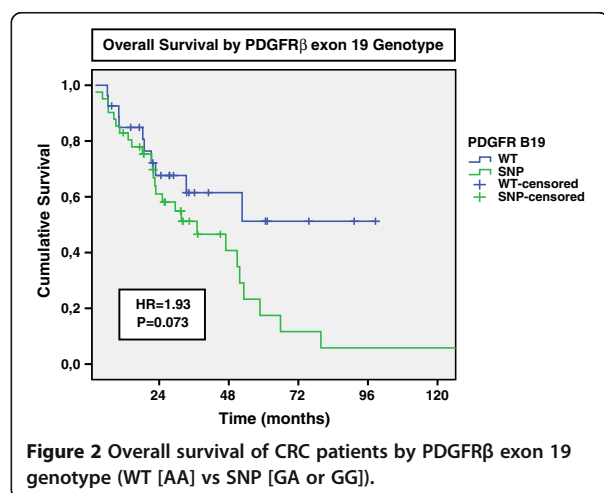
WT: wild type; SNP: single nucleotide polymorphism; N: number; 5y: 5 years; HR: hazard ratio; NR: not reached.

cancer. In this regard, Schimanski and cols reported that specific receptor tyrosine kinases (TK) were overexpressed in K-ras mutated CRC [22]. In particular, VEGFR1, VEGFR2 and PDGFR $\alpha$  expression, documented in 95%, 46% and 62% of tested samples, respectively, were significantly linked to K-ras codon 12 or 13 mutations. Whether this could translate into a higher likelihood of responding to TK inhibitors, however, is a matter of speculation. On the other hand, Wheler et al. reported, in a series of 99 human colorectal carcinomas, that co-expression of PDGFR $\alpha/\beta$ , observed in 57% of tumor samples, was significantly associated with lymphatic metastasis ( $P=0.007$ ) and advanced tumor stage ( $P=0.03$ ) [23]. Similarly, high PDGFR $\beta$  tumor stromal expression significantly correlated with more aggressive clinical behavior in patients with breast cancer, including high histopathological grade, estrogen receptor negativity, high HER2 expression and shorter survival [24].

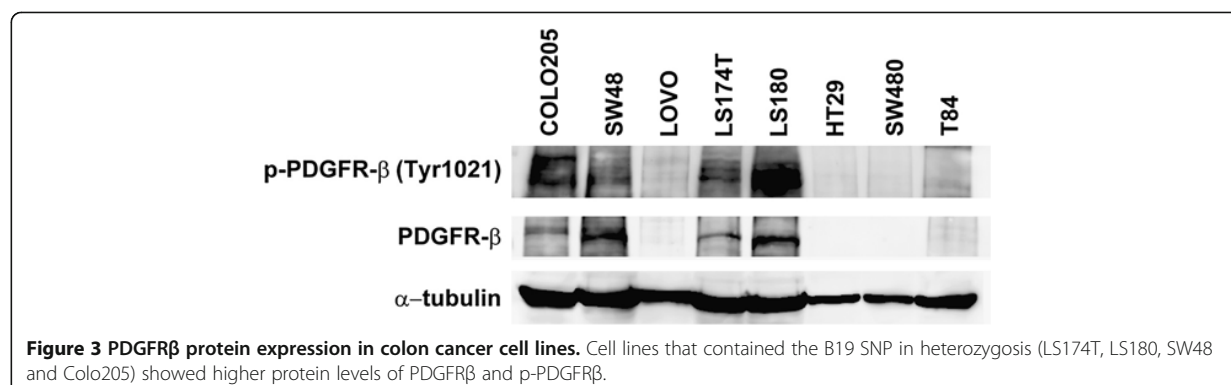
Nevertheless, PDGFR genetic variants had never been previously assessed in CRC patients. In our study, four genetic variants were identified, all of them corresponding to SNPs previously reported in public databases.

Three of them were silent mutations (A12, A13 and B19) and the other one was an intronic insertion (A17). PDGFR $\alpha$  exon 12 SNP (rs1873778), present in homozygosity in all CRC cell lines and 100% of analyzed tumor samples, has been also described in other neoplasias although in a smaller proportion of patients, including KIT and FLT3 mutation-negative core binding factor (CBFL) acute myeloid leukemias (14% of 35 patients) [25], cervical adenosquamous carcinomas (30% of 30 patients) [26] and gliomas (7% of 86 patients) [27]. In this last study, no association was found between the presence of this mutation and PDGFR $\alpha$  tissue expression. Our results are in agreement with the distribution reported for a European Caucasian population at the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>), being the G-allele the most frequently encountered ( $p=0.98$ ). PDGFR $\alpha$  exon 13 SNP (rs10028020), detected in heterozygosity in 2 (LS174T and LS180) of the 8 cell lines examined and in 18% of tumor samples, was associated with poorer tumor differentiation but no significant correlation was found with survival. This polymorphism had been first reported also in heterozygosity by Trojani et al. in 34% of CBFL acute leukemias [25], although potential association of this genotype with clinical features or patient/s outcome was not explored by these authors. Finally, neither PDGFR $\alpha$  exon 17 SNP (rs2412559), identified in all of our patients, nor PDGFR $\beta$  exon 19 SNP (rs246395), present in 58% of them, had been previously described in human cancers. PDGFR B19 SNP has been reported to be present in the general population with a frequency of 37%, and was more commonly encountered in our study population among colon primary tumors (64%) than in tumors of rectal origin (35%). Of note, and despite not being an activating mutation, the B19 SNP was found to be a significant prognostic factor (HR: 2.89,  $p=0.029$ ) independent of tumor stage or patient/s age. This negative effect on patient/s survival did not differ according to primary tumor location (data not shown).

That the identified SNP in exon 19 of PDGFR $\beta$  may indeed have relevant biological implications is further supported by the fact that analysis of protein content in cell lines demonstrated the presence of the B19 SNP clearly correlated with higher protein levels of the PDGF receptor  $\beta$ , also in its phosphorylated state. PDGF pathway constitutive activation maintains highly active MEK, thus phosphorylating Bad and inhibiting apoptosis [14,15]. Increased PDGF pathway activation has been also shown to contribute to drug resistance by activating the PI3K pathway [14,15]. Whether or not the presence of this SNP may portend particular sensitivity to PDGFR-targeted agents is a matter of speculation but certainly deserves further investigation due to its relevant potential clinical applications.



**Figure 2 Overall survival of CRC patients by PDGFR $\beta$  exon 19 genotype (WT [AA] vs SNP [GA or GG]).**



On the contrary, no relevant findings were identified in our series regarding VEGFR2 TK domain SNP analysis. As in other solid tumors, overexpression of VEGF mRNA and protein has been associated with tumor progression and poor prognosis of colon carcinoma [28]. The VEGF-A gene is known to be highly polymorphic and harbors numerous SNPs, especially in the promoter, 5'- and 3'-untranslated regions (UTR), which contain key regulatory elements that are sensitive to hypoxia [29]. These SNPs contribute to the high variability in VEGF production among tissues and have been associated with cancer susceptibility, progression, and anti-VEGF therapeutic response in subjects with a variety of solid tumors including colorectal cancer. For example, the 936 T-allele has been associated with increased risk of CRC, advanced stage of disease and worse prognosis, whereas the 634 C allele was predictive of decreased risk and improved survival. SNPs have also been identified in the VEGF receptor genes, although the literature in this topic is still very sparse. Very recently, the VEGFR-1 319 C/A SNP, located in the promoter region of the gene, has been reported to be associated with response to therapy in a cohort of 218 CRC patients treated with different bevacizumab-containing regimens [30]. In this study by Hansen et al., response rates were significantly higher in patients homozygous for the A-allele (AA) than in patients with the C-allele genotype (CC or CA) (56% vs 39%,  $p=0.015$ ). Similar results were also documented in bevacizumab-treated pancreatic cancer patients [31]. In addition, functional relevance has been demonstrated for several SNPs in the VEGFR-1 and VEGFR-2 genes, particularly SNPs 1192C/T (V2971I; rs2305948) and 1719T/A (H472Q; rs1870377). These SNPs are located in exons 7 and 11, and lead to amino acid changes potentially interfering with the receptor's binding affinity to VEGF-A. In the current study, however, we aimed to explore potential genetic variations in the TK domain of the VEGFR-2 (exons 17 to 26), which would be expected to have relevant functional consequences. No mutations were however detected in our study population in these gene domains.

Identification of relevant SNPs in critical genes involved in angiogenesis may therefore become valuable tools in assessing risk or predicting cancer response to therapy or prognosis. However, no consensus exists at present regarding the use of any of these for clinical decisions as many studies have reported diverging, conflicting or inconclusive results. Multiple reasons may be responsible for these discrepancies, including gender and interethnic differences in the distribution of alleles, heterogeneous study populations and small sample sizes, different sources of DNA (i.e., tumor vs germline) and different methods for SNP analyses, lack of corrections for multiple testing, links to other loci in the gene or related genes responsible for the observed effect, bias due to post-transcriptional gene regulation, or simultaneous presence of somatic or epigenetic changes that may influence outcome. Prospective validation in appropriately sized and controlled studies is therefore required before these genetic variants may be used in clinical practice.

### Conclusion

In conclusion, the present study has identified, for the first time, PDGFR $\beta$  genetic variants with relevant clinical and biological implications. In particular, the G-allele genotype of PDGFR $\beta$  exon 19 SNP (rs246395), which was commonly encountered in our series of CRC patients (58%), was associated with increased pathway activation and poorer survival. Further studies to assess the functional consequences of this genetic variant, as well as to validate its role as a prognostic marker in this disease are certainly warranted. Implications regarding its potential influence in response to PDGFR-targeted agents remain to be elucidated.

### Additional file

**Additional file 1:** Supplementary Tables.

### Competing interests

The authors declare no conflict of interest.



#### Authors' contributions

Conception and design: RGC, ACM, LPA. Molecular genetic and protein analysis in human samples and cancer cell lines: ACM, JI, SMP, MDP, SM. Pathological assessment: AC, FLR. Collection and assembly of data: ACM, JI, ILC, SMP, MDP, SM, PEG, RGC. Data analysis and interpretation: RGC, LPA, ACM, JI, AC, PEG. Manuscript writing: PEG, SMP, AC, LPA, RGC. Final approval of manuscript: All authors.

#### Novelty and impact of present research

This study has identified, for the first time, PDGFR $\beta$  genetic variants with relevant clinical and biological implications in colorectal cancer. In particular, the G-allele genotype of PDGFR $\beta$  exon 19 SNP (rs246395), encountered in 58% of tumor samples from colorectal cancer patients, was associated with increased pathway activation and significantly poorer survival.

#### Acknowledgements

We would like to thank the technical staff from Bionostra for technical assistance. This work was supported by a grant of the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain (FIT-010000-2006-45). PEG is funded by a Rio Hortega grant (09/00207) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Sanidad, Spain. SMP is funded by the ISCIII (CD1100153), Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), Consejería de Salud – Junta de Andalucía (PI-0224/2009) and Fundacion Mutua Madrileña (2009). MDP is funded by the ISCIII (CD0900148). LPA is funded by the ISCIII (PI081156 and PI1102688), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa – Junta de Andalucía (P08-CVI-04090) and the 75<sup>th</sup> Anniversary Roche Spain Fellowship. RGC is funded by the ISCIII (PI 10.02164).

#### Author details

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) (HUVR, CSIC, Universidad de Sevilla), Sevilla, Spain. <sup>2</sup>Medical Oncology Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain. <sup>3</sup>Pathology Department, Hospital de Fuenlabrada, Madrid, Spain. <sup>4</sup>Bionostra Aplicaciones Biotecnológicas, S.L.U., Madrid, Spain. <sup>5</sup>Pathology Department, Centro Integral Oncológico Clara Campal, Madrid, Spain.

Received: 22 June 2012 Accepted: 28 October 2012

Published: 12 November 2012

#### References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: *GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 31/08/2011.
2. Veitez JM, García-Carbonero R, Aparicio J, Feliu J, González-Flores E, Grande E, Pérez-Hoyos T, Salud A, Torres E, Valero M, Valladares-Ayerbes M, Díaz-Rubio E: **Recommendations and expert opinion on the adjuvant treatment of colon cancer in Spain.** *Clin Transl Oncol* 2011, **13**(11):798–804.
3. García-Carbonero R, Gómez España MA, Casado Sáenz E, Alonso Orduña V, Cervantes Ruipérez A, Gallego Plazas J, García Alfonso P, Juez Martel I, González Flores E, Lomas Garrido M, Isla Casado D: **SEOM clinical guidelines for the treatment of advanced colorectal cancer.** *Clin Transl Oncol* 2010, **12**(11):729–734.
4. Aranda E, Abad A, Carrato A, Cervantes A, García-Foncillas J, García Alfonso P, García Carbonero R, Gómez España A, Tabernero JM, Díaz-Rubio E: **Treatment recommendations for metastatic colorectal cancer.** *Clin Transl Oncol* 2011, **13**(3):162–178.
5. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F: **Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2004, **350**(23):2335–2342.
6. Joulain F, Van Cutsem E, Usman I, Hoyle M, Allegra C: **Afilibercept versus placebo in combination with FOLFIRI in previously treated metastatic colorectal cancer (mCRC): Mean overall survival (OS) estimation from a phase III trial (VELOUR).** *J Clin Oncol* 2012, **30**:s3602.
7. Van Cutsem E, Sobrero AF, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouche O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Tabernero J, Yoshino T, Lenz HJ, Goldberg RM, Sargent DJ, Cihon F, Wagner A, Laurent D, Grothey A, on behalf of CORRECT Investigators: **Phase III CORRECT trial of regorafenib in metastatic colorectal cancer (mCRC).** *J Clin Oncol* 2012, **30**(suppl; abstr 3502).
8. Carmeliet P, Jain RK: **Angiogenesis in cancer and other diseases.** *Nature* 2000, **407**:249–257.
9. Weis SM, Cheresh DA: **Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability.** *Nature* 2005, **437**:497–504.
10. Sakurai T, Kudo M: **Signaling pathways governing tumor angiogenesis.** *Oncology* 2011, **81**(Suppl 1):24–29.
11. Arora A, Scholar EM: **Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy.** *J Pharmacol Exp Ther* 2005, **315**:971–979.
12. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM: **An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling.** *Nature Rev Clin Oncol* 2009, **6**:569–579.
13. Hoch RV, Soriano P: **Roles of PDGF in animal development.** *Development* 2003, **130**:4769–4784.
14. Yu J, Ustach C, Kim HR: **Platelet-derived growth factor signaling and human cancer.** *J Biochem Mol Bio* 2003, **36**(1):49–59.
15. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C: **Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine.** *Genes Dev* 2008, **22**(10):1276–1312.
16. Carrato A, Swieboda-Sadlej S-S, Lim R, Roman L, Shparyk Y, Bondarenko I, Lin X, Lechuga MJ, Tursi JM, Sun Y, De la Cruz JA, Jonker D, Van Cutsem E: **Final results from a randomized, double-blind, phase III study of sunitinib plus FOLFIRI vs placebo plus FOLFIRI in first-line treatment of patients (pts) with metastatic colorectal cancer.** In *Proceedings of the 12<sup>th</sup> World Cancer on Gastrointestinal Cancer*. Barcelona, Spain: 2010;O-0026. 30 June-3 July.
17. Tabernero J, García-Carbonero R, Köhne CH, et al: **A phase 2b, double-blind, randomized study evaluating the efficacy and safety of sorafenib (SOR) compared with placebo (PBO) when administered in combination with chemotherapy (modified FOLFOX6) for first-line treatment (tx) of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC), the RESPECT trial.** In *Proceeding of the 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress*. Stockholm, Sweden: Abstract LBA19; 2011. 23–27 September.
18. In *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th edition. Edited by Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A: Springer; 2010.
19. Kaplan EL, Meier P: **Non parametric estimation from incomplete observations.** *J Am Stat Soc A* 1972, **35**:185–206.
20. Peto R, Peto J: **Asymptotically efficient rank invariant tests procedures.** *J R Stat Soc A* 1972, **135**(2):185–207.
21. Cox DR: **Regression models and life tables.** *J R Stat Soc B* 1972, **34**:187–220.
22. Schimanski CC, Zimmermann T, Schmidtmann I, Gockel I, Lang H, Galle PR, Moehler M, Berger MR: **K-ras mutation status correlates with the expression of VEGFR1, VEGFR2, and PDGFRalpha in colorectal cancer.** *Int J Colorectal Dis* 2010, **25**(2):181–186.
23. Wehler TC, Frerichs K, Graf C, Drescher D, Schimanski K, Biesterfeld S, Berger MR, Kanzler S, Junginger T, Galle PR, Moehler M, Gockel I, Schimanski CC: **PDGFRalpha/beta expression correlates with the metastatic behavior of human colorectal cancer: a possible rationale for a molecular targeting strategy.** *Oncol Rep* 2008, **19**(3):697–704.
24. Paulsson J, Sjöblom T, Micke P, Pontén F, Landberg G, Heldin CH, Bergh J, Brennan DJ, Jirstrom K, Ostman A: **Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer.** *Am J Pathol* 2009, **175**(1):334–341.
25. Trojani A, Ripamonti CB, Penco S, Beghini A, Nadali G, Di Bona E, Viola A, Castagnola C, Colapietro P, Grillo G, Pezzetti L, Ravelli E, Patrosso MC, Marocchi A, Cuneo A, Ferrara F, Lazzarino M, Pizzolo G, Cairoli R, Morra E: **Molecular analysis of PDGFRA and PDGFRB genes by rapid single-strand conformation polymorphism (SSCP) in patients with core-binding factor leukaemias with KIT or FLT3 mutation.** *Anticancer Res* 2008, **28**(5A):2745–2751.
26. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Martinho O, Moreira MA, Ribeiro LF, Queiroz GS, Schmitt FC, Baltazar F, Reis RM: **Molecular characterization of EGFR, PDGFRA and VEGFR2 in cervical adenosquamous carcinoma.** *BMC Cancer* 2009, **9**:212.
27. Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MB, Martins A, Pinheiro C, Silva A, Pardal F, Amorim J, Mackay A, Milanezi F, Tamber N, Fenwick K, Ashworth A, Reis-Filho JS, Lopes JM, Reis RM: **Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas.** *Br J Cancer* 2009, **101**(6):973–982.
28. Hansen TF, Jakobsen A: **Clinical implications of genetic variations in the VEGF system in relation to colorectal cancer.** *Pharmacogenomics*. 2011, **12**(12):1681–1693.
29. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, Venitz J, Figg WD: **The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive**

- and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2009, **8**:2496–2508.
30. Hansen TF, Christensen RD, Andersen RF, Spindler KL, Johnsson A, Jakobsen A: **The predictive value of single nucleotide polymorphisms in the VEGF system to the efficacy of first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: Results from the Nordic ACT trial.** *Int J Colorectal Dis* 2012, **27**(6):715–720.
31. Lambrechts D, Claes B, Delmar P, Reumers J, Mazzone M, Yesilyurt BT, Devlieger R, Verslype C, Tejpar S, Wildiers H, de Haas S, Carmeliet P, Scherer SJ, Van Cutsem E: **VEGF pathway genetic variants as biomarkers of treatment outcome with bevacizumab: an analysis of data from the AVITA and AVOREN randomised trials.** *Lancet Oncol* 2012, **13**(7):724–733.

doi:10.1186/1471-2407-12-514

**Cite this article as:** Estevez-Garcia *et al.*: PDGFR $\alpha$ / $\beta$  and VEGFR2 polymorphisms in colorectal cancer: incidence and implications in clinical outcome. *BMC Cancer* 2012 **12**:514.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## Spinophilin Loss Correlates with Poor Patient Prognosis in Advanced Stages of Colon Carcinoma

Purificacion Estevez-Garcia<sup>1,2</sup>, Iker Lopez-Calderero<sup>1,2</sup>, Sonia Molina-Pinelo<sup>1</sup>, Sandra Muñoz-Galvan<sup>1</sup>, Ana Salinas<sup>1</sup>, Lourdes Gomez-Izquierdo<sup>3</sup>, Antonio Lucena-Cacace<sup>1</sup>, Blanca Felipe-Abrio<sup>1</sup>, Luis Paz-Ares<sup>1,2</sup>, Rocio Garcia-Carbonero<sup>1,2</sup>, and Amancio Carnero<sup>1,4</sup>

### Abstract

**Purpose:** The genomic region 17q21 is frequently associated with microsatellite instability and LOH in cancer, including gastric and colorectal carcinomas. This region contains several putative tumor suppressor genes, including *Brca1*, *NM23*, *prohibitin*, and *spinophilin* (*Spn*, *PPP1R9B*, *neurabin II*). The scaffold protein Spn is one of the regulatory subunits of phosphatase-1 (PP1) that targets PP1 to distinct subcellular locations and couples PP1 to its target. Thus, Spn may alter cell-cycle progression via the regulation of the phosphorylation status of the retinoblastoma protein, a direct target of PP1. Therefore, we analyzed whether Spn levels were reduced in colorectal carcinomas and whether Spn levels correlated with prognosis or response to therapy.

**Experimental Design:** By means of immunohistochemistry or quantitative PCR, we studied the levels of Spn in stages II, III, and IV colorectal carcinoma tumors and correlated to other clinicopathologic features as well as prognosis or response to therapy.

**Results:** Spn was lost in a percentage of human gastric, small intestine, and colorectal carcinomas. In patients with colorectal carcinoma, tumoral Spn downregulation correlated with a more aggressive histologic phenotype (poorer tumor differentiation and higher proliferative Ki67 index). Consistent with this observation, lower Spn protein expression levels were associated with faster relapse and poorer survival in patients with stage III colorectal carcinoma, particularly among those receiving adjuvant fluoropyrimidine therapy. We validated this result in an independent cohort of patients with metastatic colorectal carcinoma treated with standard chemotherapy. Although patients that achieved an objective tumor response exhibited Spn levels similar to nontumoral tissue, nonresponding patients showed a significant reduction in *Spn* mRNA levels.

**Conclusions:** Our data suggest that Spn downregulation contributes to a more aggressive biologic behavior, induces chemoresistance, and is associated with a poorer survival in patients with advanced stages of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*; 19(14); 3925–35. ©2013 AACR.

### Introduction

Colorectal carcinoma is one of the most common malignant tumors worldwide (1). Despite advances in early detection, approximately one third of patients present with metastatic disease at diagnosis, and approximately 40% of

patients with early-stage tumors eventually relapse over the course of their disease (2). Systemic therapy is the mainstay of care for patients with metastatic colorectal carcinoma (mCRC). Several combination regimens, including fluoropyrimidines and oxaliplatin and/or irinotecan, with or without monoclonal antibodies targeting VEGF or EGF receptor, have been successfully developed and are associated with response rates of 40% to 60% and a median survival of 20 to 24 months (3–5). Despite the undeniable progress, a considerable proportion of patients do not respond to therapy, and reliable tools are needed to prospectively identify those patients who are more likely to benefit.

Colon carcinogenesis represents a stepwise progression from benign polyps to invasive adenocarcinoma that is believed to be the consequence of multiple sequential genetic and epigenetic alterations (6). Approximately, 15 driver mutations have been identified to be relevant in colorectal carcinoma carcinogenesis. These mutations affect cell proliferation, migration, differentiation, adhesion, cell death,

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla, HUVR/CSIC/Universidad de Sevilla; Departments of <sup>2</sup>Oncology and <sup>3</sup>Pathology, Hospital Universitario Virgen del Rocío; and <sup>4</sup>Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla, Spain

**Note:** Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

P. Estevez-Garcia, I. Lopez-Calderero, and S. Molina-Pinelo contributed equally to this work.

**Corresponding Author:** Amancio Carnero, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Manuel Siurot, Sevilla 41013, Spain. Phone: 34-955923111; Fax: 34-955923111; E-mail: acarnero@ibis-sevilla.es

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0057

©2013 American Association for Cancer Research.

### Translational Relevance

Our data are the first report to show that Spn down-regulation contributes to a more aggressive biologic behavior, induces chemoresistance, and is associated with a poorer survival in patients with advanced stages of cancer, in this case colorectal carcinoma. Therefore, the identification of the levels of Spn in advanced stages of colorectal tumor biopsies might contribute to select patients who could or could not benefit from current chemotherapy. Spn, also known as PPP1A9B, is a regulator of PP1a, a phosphatase regulating many crucial aspects such as cell-cycle G<sub>1</sub> transition through the regulation of retinoblastoma phosphorylated status. Spn is located in the 17q21 region. 17q21 is frequently associated with microsatellite instability and LOH in cancer, and therefore our work might uncover the relevance of Spn as relevant gene inside this locus and also in other tumors.

and DNA stability and repair (7). The most commonly involved pathways include the Wnt/ $\beta$ -catenin, TGF- $\beta$ /BMP, TP53, receptor tyrosine kinases, K-RAS, and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathways (8).

Furthermore, a number of chromosomal regions are altered in colorectal carcinomas (9). Among them, 17q21 is lost in a high percentage of colorectal and gastric carcinomas (10–13). This is a region frequently associated with microsatellite instability and LOH. This region contains several putative tumor suppressor genes, including *Brcal*, *NM23*, *prohibitin*, and *spinophilin*. We have previously found that *Spn* mRNA is lost in a percentage of renal carcinomas and lung adenocarcinomas (14, 15). Interestingly, analysis of normal versus tumoral central nervous system samples showed a clear downregulation of Spn in tumoral samples (14). Furthermore, lower levels of *Spn* mRNA correlated with a higher grade in ovarian carcinoma and chronic myelogenous leukemia (14).

Spinophilin (also known as neurabin II and PPP1R9B) was isolated independently by two laboratories and has been shown to interact with protein phosphatase 1 (PP1) and F-actin (16, 17). Genetic and biochemical analyses have revealed a number of distinct modular domains in Spn that govern protein–protein interactions (17–21). Spn may contribute to tumorigenesis through PP1/pRB regulation (22). Accordingly, the loss of Spn maintains higher levels of phosphorylated retinoblastoma (Rb). This effect contributes to an increase in p53 activity through an increase in the ADP ribosylation factor (ARF) protein. However, in the absence of p53, reduced levels of Spn increase the tumorigenic properties of cells. *In vivo*, Spn knockout mice have a reduced lifespan, an increased number of tumors, and increased cellular proliferation (23). In addition, the combined loss of Spn and p53 activity leads to an increase in mammary carcinomas, confirming the functional relationship between p53 and Spn.

Taking into consideration the relationship of Spn with cell-cycle regulation, the effect of Spn loss in knockout models and its previously suggested role as a tumor suppressor in other tumors, the objective of the present study was to explore the role of Spn in colorectal carcinoma. With this purpose, we assessed the functional consequences of Spn loss in colorectal carcinoma tumors and its impact in the clinical outcome of patients with stage II–IV colorectal carcinoma.

### Materials and Methods

#### Patient population and tumor samples

In the present work, we analyzed two different cohorts of patients, whose main characteristics are summarized in Supplementary Tables S1 (cohort 1) and S2 (cohort 2). Cohort 1 included patients with stages II and III colorectal carcinoma, whereas cohort 2 comprised patients with metastatic stage IV colorectal carcinoma.

**Cohort 1.** Cohort 1 comprised 218 patients with surgically resected stage II and III colorectal carcinoma. High-risk stage II and all stage III patients received adjuvant fluoropyrimidine chemotherapy following surgery, unless medically contraindicated. Tissue arrays were generated with formalin-fixed, paraffin-embedded surgical primary tumor specimens for immunohistochemical staining.

**Cohort 2.** Cohort 2 was used to study Spn mRNA levels. This cohort comprised 86 tumor samples and 33 nontumor control samples from patients with mCRC (stage IV). Following surgical resection, tumor tissue samples were collected from all patients and immediately snap-frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use. All patients were treated with fluoropyrimidine-based chemotherapy plus oxaliplatin or irinotecan until disease progression. Patients were classified according to best response to chemotherapy in two groups: responders ( $N = 46$ ) or those that achieved an objective response (complete or partial response) and nonresponders ( $N = 40$ ) or those whose best response to therapy was either stable or progressive disease. Tumor response was evaluated by conventional methods according to the standard Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 1.0 criteria: a complete response (CR) was defined as the disappearance of all measurable and evaluable evidence of disease; a partial response (PR) was defined as a more than 30% decrease in the sum of the longest diameters of target lesions; stable disease was considered if the tumor burden decreased less than 30% or increased less than 20%; and progressive disease (PD) was indicated by a more than 20% increase in the sum of the longest diameters of target lesions or the appearance of any new lesion. The study protocol was approved by the Institutional Review Board and Ethical Committee of participating institutions. All patients provided informed consent.

#### Statistical analyses

All statistical analyses were conducted using the SPSS statistical package (16.0 for Windows). The potential association between continuous or categorical variables was assessed by the Pearson correlation coefficient or by the

$\chi^2$  or Fisher exact test, respectively. The distribution of quantitative variables among different study groups was assessed using parametric (Student *t* test) or nonparametric (Kruskal–Wallis or Mann–Whitney) tests, as appropriate. Disease-free interval (DFI) and overall survival (OS) of patients were calculated using the Kaplan–Meier method, and differences among subgroups were assessed by the log-rank test. The Cox proportional hazards method was used for multivariate analysis to assess the influence of Spn expression on DFI and OS, while adjusting for other potential confounding factors such as age, tumor–node–metastasis (TNM) stage, tumor grade, or adjuvant chemotherapy. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

### Histopathology and immunohistochemistry

Tissue or tumor samples were dissected and fixed in 10% buffered formalin. Formalin-fixed tissues were embedded in paraffin and a tissue microarray (TMA) was generated. For histopathologic analysis, TMAs were sectioned (2.5  $\mu$ m) and stained with hematoxylin and eosin stain. The slides were baked overnight at 56°C, deparaffinized in xylene, rehydrated, and washed with PBS. Epitope retrieval was conducted using sodium citrate (pH 6.5). Endogenous peroxidase activity was quenched with 1.5% hydrogen peroxide in methanol for 10 minutes. Incubation (40 minutes) was carried out with anti-spinophilin, which was purchased from Chemicon (AB5669). The secondary antibodies used were as follows: horseradish peroxidase goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG; Dako) diluted 1:50; horseradish peroxidase goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) diluted 1:50; and horseradish peroxidase rabbit anti-goat IgG (Dako) diluted 1:50. After incubation, immunodetection was carried out with the peroxidase-based PAP system (Dako) using diaminobenzidine as substrate. Incubations omitting the specific antibody were used as a negative control. Spn protein tissue expression intensity was assessed twice by an investigator blinded to the clinical information. A discrete value was assigned to each observation ranging from 0 (no Spn expression) to 3 (high expression, similar to normal colon tissue), and the average value calculated for each tumor. Score was obtained by multiplying the intensity by the percentage of positive cells.

### RNA isolation from samples

Total RNA, containing small RNA, was extracted from tumor and normal tissue control samples by the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. The total RNA yield was determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Tech).

### Spn quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using TRI-Reagent (Sigma) according to the manufacturers' instructions. After RNA isolation, DNase I (Roche) treatment was carried out using 40 U of enzyme in the presence of 40 U of RNase inhibitor (Roche) per sample at 37°C for 1 hour. Following phenol–chloroform purification, the RNA was quantified using a

NanoDrop 1000 spectrophotometer and quality-checked using a MOPS-1,2% agarose gel. cDNA synthesis was carried out using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with 1  $\mu$ g of total RNA as the starting material for each sample. The PCR reactions were carried out in 96-well optical plates (Applied Biosystems) with an ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems). The reaction mix was prepared using 1 $\times$  SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems), 50 nmol/L of each primer [Spn: 5' GCCCAGCTAATTCAGCAGAC 3' (forward), 5' GGAGCTCCTTGAACCTGTGC 3' (reverse); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 5' GAGTCAACGGATTGGTTCGT 3' (forward), 5' TTGATTTGGAGGGATCTCG 3' (reverse)], and 100 ng of cDNA in a final volume of 50  $\mu$ L. The cycling conditions were set to 10 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. Finally, a dissociation curve was generated to check the amplification specificity. The results were analyzed and the relative mRNA quantity was calculated using the qBase-Plus software. Cyclophilin (ref. 4326316E), an endogenous control, was used to normalize variations in cDNA quantities from different samples. Each reaction was carried out in triplicate with cDNA from tumor tissues from each patient.

### Methylation-specific PCR

Genomic DNA was isolated from fresh tissue using QIAamp DNA Mini Extraction Kit (Qiagen Inc.) and DNA concentration was measured by 260-nm absorbance. Total genomic DNA (1  $\mu$ g) was treated with sodium bisulfite reagent using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) following the manufacturer's protocol. In each methylation-specific PCR (MSP) reaction, 40 ng of final product was used in a 20  $\mu$ L volume containing 10  $\mu$ L 2 $\times$  Zymo Taq DNA polymerase master mix (Zymo Research), 0.25 mmol/L of deoxynucleotide triphosphate and 0.3  $\mu$ mol/L of each primer in a G-Storm Thermal Cycler (Gene Technologies). For human *Spn*, one pair of methylated (M) primers and one pair of unmethylated (U) primers covering the same region were used to analyze DNA methylation at the 5' proximal region within the CpG island identified by UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>). The primers used in MSP are: MSP-M, forward, 5'- TTGGTTAGTCGTTTGTGAAGC-3', reverse, 5'- TAATAAACCCCT-TAAATACCTCGT-3', and MSP-U, forward, 5'- ATTTGGTTAGTTGTTTGTGAAGTG-3', reverse, 5'- AATAAACCCCTTAAATACCTCATC-3'. Each reaction was heated at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 62°C (primers specific for methylated C) or 30 seconds at 57°C (primers specific for unmethylated C), and 30 seconds at 72°C, followed by a final 10-minute extension at 72°C. Ten microliters of each PCR reaction were loaded directly in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualized under UV illumination.

### Cell culture, retroviral vectors, and gene transfer

The cells were grown and processed following previously described (24).



**Colony formation**

Briefly, colorectal carcinoma cells were transfected with the indicated construct. After 16 hours, a glycerol shock was carried out, and the cells were cultured at 37°C. Forty-eight hours after transfection, the cells were selected with 0.5 µg/mL of puromycin. After 12 days, the plates were fixed and the colonies were stained with crystal violet.

**Growth in soft agar**

To measure anchorage-independent growth and foci formation, we followed a previously described protocol. Colonies were scored 3 weeks after seeding; all values were determined in triplicate.

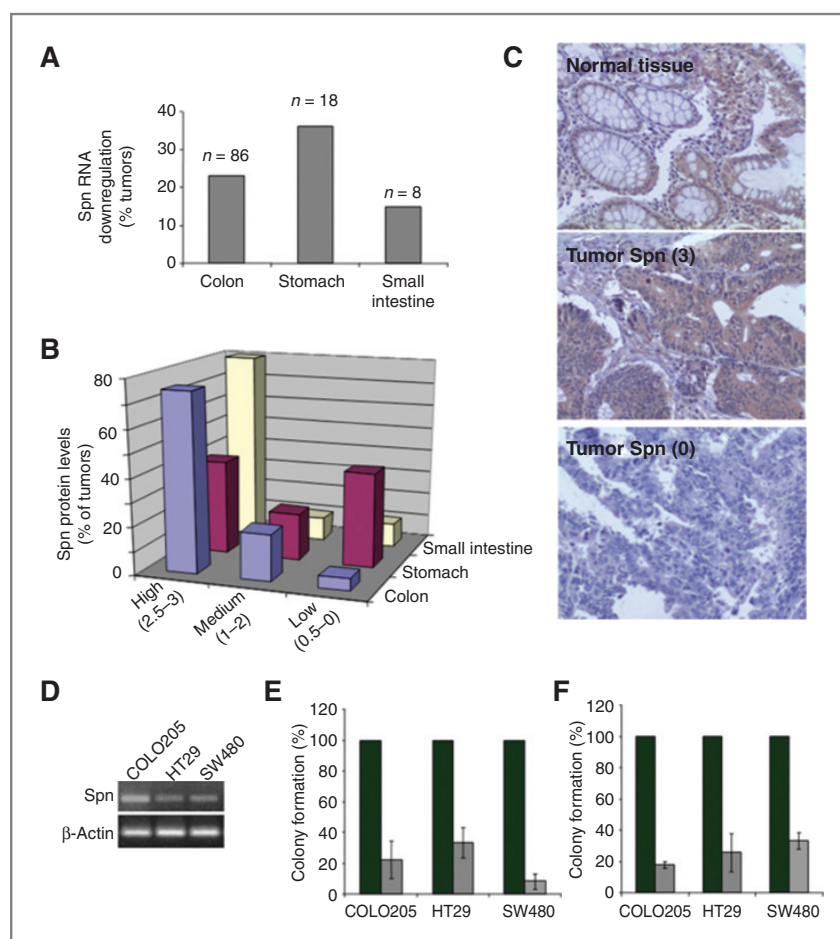
**Results**

**Loss of Spn in gastrointestinal tract tumors**

To first study whether Spn is downregulated in human colorectal carcinoma, we explored whether RNA or protein levels were decreased in tumor samples. To broadly analyze whether *Spn* RNA levels showed variations in colorectal

carcinoma samples, we first determined Spn mRNA expression levels using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in several paired normal/tumoral tissue samples from the same patient (cohort 2). Approximately, 25% of colorectal carcinoma tumors showed a greater than 50% decrease in Spn mRNA levels compared with normal colonic tissue (Fig. 1A). Interestingly, a percentage of samples from gastric (35% approx) and intestinal (15%) carcinomas also showed partial or complete loss of *Spn* mRNA expression (Fig. 1A).

To confirm this result by specifically exploring the presence of Spn protein, we generated a tissue array of 218 human colorectal carcinoma, 20 gastric, and 20 small intestinal tumors at different stages and with different histopathologic grades and compared them with normal tissue (cohort 1). We found that 70% of colorectal carcinoma tumors displayed high Spn levels (mean values 2.5–3), similar to the values observed in normal colonic tissue, 20% showed intermediate Spn levels and approximately 10% of tumors showed no expression of Spn (Fig. 1B and



**Figure 1.** Loss of Spn in human colorectal carcinoma tumors. A, the percentage of human colon, gastric, and intestinal tumors showing low or no levels of *Spn* mRNA is shown. The results were obtained using qRT-PCR for *Spn*. Then, the ratio of Spn levels in tumor/normal samples was calculated. Only the tumors with a ratio of less than 0.5 were considered positive. B, the percentage of human colon, gastric, and intestinal tumors showing high, medium, or low levels of Spn protein is shown. C, representative pictures of normal crypt and different colorectal carcinoma tumors with different Spn levels are shown. The visual score is indicated in parentheses. D, the cells used in this study express Spn. The cells were grown to 80% confluence and the mRNA was extracted. The figure indicates the RT-PCR results for Spn as indicated in the Materials and Methods section. E and F, the effects of Spn overexpression were determined. Colon cancer cell lines were infected with a retrovirus carrying *Spn* cDNA (gray bars) or empty vector (black bars). After selection, the cells were seeded at low density to measure clonogenicity (E) or the ability to grow in soft agar (F) as indicated in the Materials and Methods section. The graph shows the average of 3 independent experiments; the bars indicate the standard deviation.

C). Similar data were obtained with other gastrointestinal tumors. Small intestine tumor samples showed Spn protein levels similar to those of the colorectal carcinoma samples. However, a significantly greater proportion of gastric carcinomas showed a complete loss of Spn expression, as 30% of tumors had very low or null levels of Spn (Fig. 1B).

Because of the relevance of colorectal carcinoma and the availability of larger number of tumor samples, we focused on this malignancy to validate the role of Spn as a prognostic and/or predictive factor.

A similar proportion of cases showed reduced Spn levels independent of whether the analysis was conducted on mRNA or protein, suggesting that Spn downregulation occurs in most cases through the regulation of mRNA levels. To further explore this result, we analyzed *Spn* promoter methylation in 32 mCRC samples and found that this gene was not methylated in any of the tumor samples analyzed (Supplementary Fig. S1).

#### Causal effect of Spn loss in colon and stomach tumor cell lines

To evaluate the potential of Spn to act as tumor suppressor, we analyzed the effect of altering Spn levels by ectopically overexpressing *Spn* cDNA in colon tumor cell lines. Because of the functional relationship between Spn and p53 loss (22), we selected tumor cell lines with mutant or WT p53. To that end, we used the colon carcinoma cell lines COLO205 (with wild-type p53) and HT29 and SW480 (with mutant p53). These cells express normal Spn mRNA (Fig. 1D). To evaluate the effect of Spn overexpression, we transfected the cells with *Spn* cDNA under constitutively expressing promoters. Overexpression of *Spn* significantly reduced the number of colonies that were able to grow in all

cell lines independently of p53 status (Fig. 1E). Next, we selected a population of cells expressing the *Spn* gene and seeded them in soft agar to evaluate their ability to grow with contact inhibition. We observed that cells that overexpressed Spn had reduced growth in soft agar, forming fewer colonies (Fig. 1F) that were smaller in size (data not shown). On the other hand, the reduction of Spn levels by means of overexpression of *Spn* shRNA increased the number of colonies growing at low density and in the presence of contact inhibition (Supplementary Fig. S2)

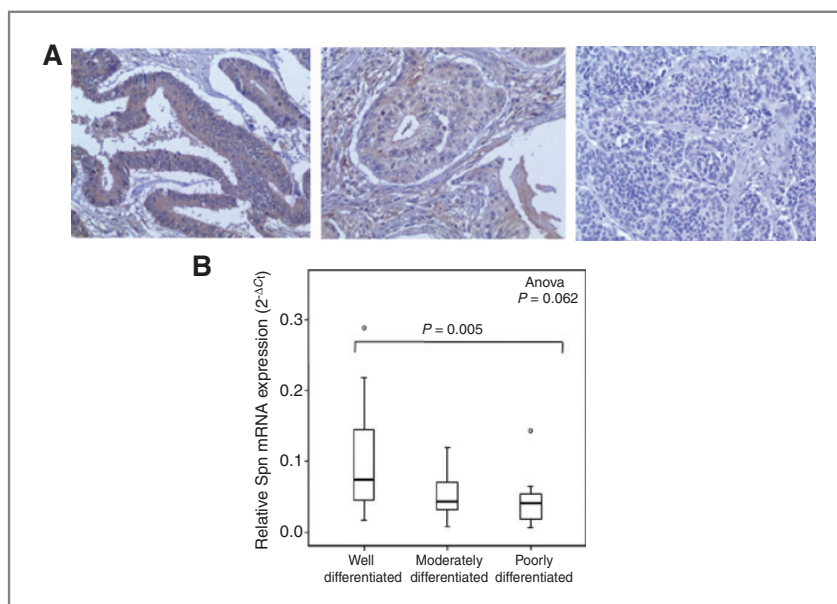
Therefore, our data suggest that Spn loss in colorectal carcinoma tumors might contribute to tumor cell malignancy and that the growth inhibitory effect induced by Spn overexpression is independent of the presence or absence of mutated p53 in colon tumor cell lines.

#### Correlation of Spn loss with other clinical and pathologic features in colon carcinoma samples

To evaluate whether Spn levels were associated with other clinical parameters, we correlated immunohistochemical staining results or mRNA levels with tumor stage, gender, age, tumor primary location, or differentiation. We found no correlation between Spn levels (either protein or mRNA) and other clinical parameters used in this study except for tumor grade of differentiation. We observed that Spn loss was significantly correlated with a less differentiated phenotype (Fig. 2) in metastatic tumors ( $P < 0.05$ ), and a similar trend was observed in earlier stages of disease (data not shown).

Furthermore, as Spn loss might increase cell-cycle progression by maintaining high levels of phosphorylated Rb protein and increasing the replicative capacity of cells, we assessed the correlation between Ki67 proliferative index

Figure 2. The relationship between Spn levels and the histologic grade of mCRC tumors was analyzed. The levels of *Spn* mRNA were analyzed in mCRC tumors (stage IV) using qRT-PCR. A correlation was established with the differentiation degree of each tumor. Statistical analyses showed borderline significance ( $P = 0.062$ ) using an ANOVA comparison among all 3 groups and strong significance ( $P = 0.005$ ) using Student *t* test comparison between well and poorly differentiated groups. Top, different tumors with different differentiation degrees and different Spn levels by immunohistochemistry. Right, well differentiated; center, moderately differentiated; left, poorly differentiated.



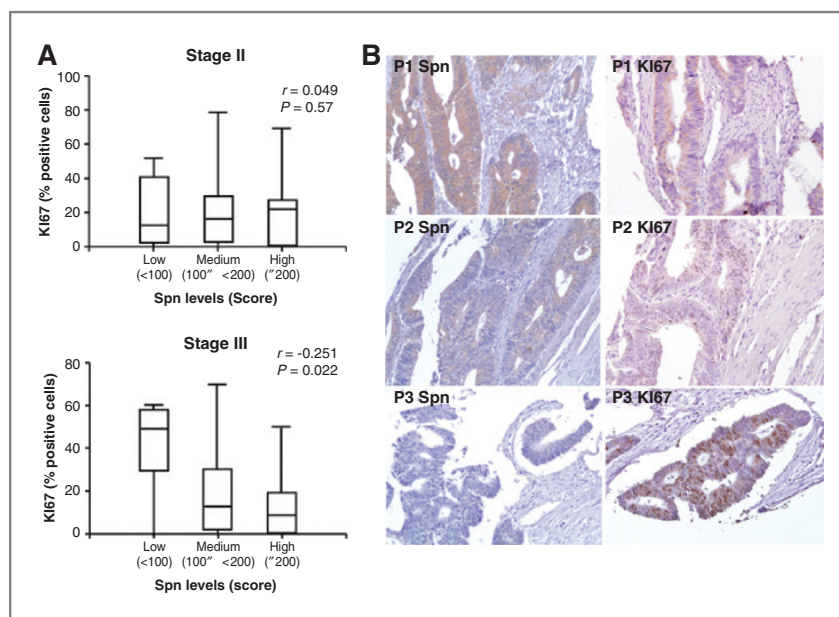


Figure 3. The relationship between loss of Spn and Ki67 nuclear staining in advanced colorectal carcinoma tumors. Cohort I samples, containing stage II and III cases, were stained for Ki67 and the percentage of tumor cells showing nuclear staining was counted. This percentage of Ki67-positive cells correlated with Spn levels (Pearson correlation). A, the graphs indicate a lack of correlation between loss of Spn and Ki67-positive cells in stage II samples ( $r = 0.049$ ,  $P = 0.577$ ) and a correlation for stage III tumors ( $r = -0.251$ ,  $P = 0.022$ ). B, examples of pictures showing the Spn/Ki67 correlation in the same patient sample. Three tumors are shown (P1, P2, and P3) stained either for Spn or Ki67. Spn levels are as follows: low, <100; medium,  $100 \leq x < 200$ ; high,  $\geq 200$ .

in tumors and Spn expression levels. We found that Spn loss correlated with an increased percentage of cells showing nuclear Ki67 staining only in stage III tumors (stage IV tumors were not analyzed), and high levels of Spn in general correlated with lower Ki67 staining (Fig. 3). Although a large variability could be observed among samples, this correlation was significant (Pearson correlation,  $P = 0.022$ ) and indicated that cells with Spn downregulation seem to have a higher proliferative capacity.

Finally, we found no correlation between lower Spn levels and mutant p53 (data not shown).

#### Decreased Spn levels predicted a poor outcome in colorectal carcinoma patients with advanced stages of disease

To evaluate whether Spn levels were associated with clinical outcome, we correlated Spn immunohistochemical staining with patient DFI and OS. Decreased Spn levels were associated with a poorer DFI ( $P = 0.106$ ) and OS ( $P = 0.022$ ) in patients with stage III colorectal carcinoma tumors, but not in those with stage II (Fig. 4). This negative effect of low Spn expression was particularly remarkable in stage III patients that had received adjuvant fluoropyrimidine chemotherapy following surgical resection (Fig. 5), suggesting Spn downregulation may also induce some degree of chemoresistance in tumor cells. However, multivariate analysis showed that a low Spn protein expression in tumors was associated with a shorter DFI ( $P = 0.068$ ) and OS ( $P = 0.019$ ), independent of other potentially confounding factors such as age or adjuvant chemotherapy (Table 1).

To further assess this hypothesis, we evaluated the association of Spn mRNA levels with tumor response to che-

motherapy in an independent cohort of 86 patients with metastatic stage IV colorectal carcinoma tumors. The relative expression levels in responders versus nonresponders to chemotherapy are represented in Fig. 6A. As shown, the transcription levels of Spn mRNA in colon tumor tissue samples of nonresponder patients were significantly lower than those observed in tumors of patients that achieved an objective response to chemotherapy ( $P = 0.017$ ), and also lower than those detected in normal colon tissue samples ( $P = 0.079$ ).

These data suggest a potential role of Spn in modulating response to cytotoxic chemotherapy in advanced colorectal carcinoma. As a control, we measured BRCA1, a neighboring gene at the 17q21 location that is commonly related to the response to chemotherapy, and found that there was no variation in the BRCA1 mRNA levels between responders and nonresponders (Fig. 6B), highlighting the relevance of Spn as a predictive factor in mCRC. Consequently, low levels of Spn mRNA were also associated with a shorter progression-free interval (PFI) and OS in this series of patients with mCRC (Fig. 6C and D).

#### Discussion

We have investigated new genes whose alteration might contribute to pRb checkpoint deregulation and, therefore, to tumorigenesis. We explored the contribution of one of these genes, which is located in 17q21, to colon cancer tumorigenesis and therapy.

Spn is lost in a percentage of gastric, intestinal, and colorectal carcinomas. Spn downregulation in colorectal carcinomas is correlated with dedifferentiation and high Ki67 expression reflecting increased proliferation. The analysis of Spn downregulation and clinical outcome of patients



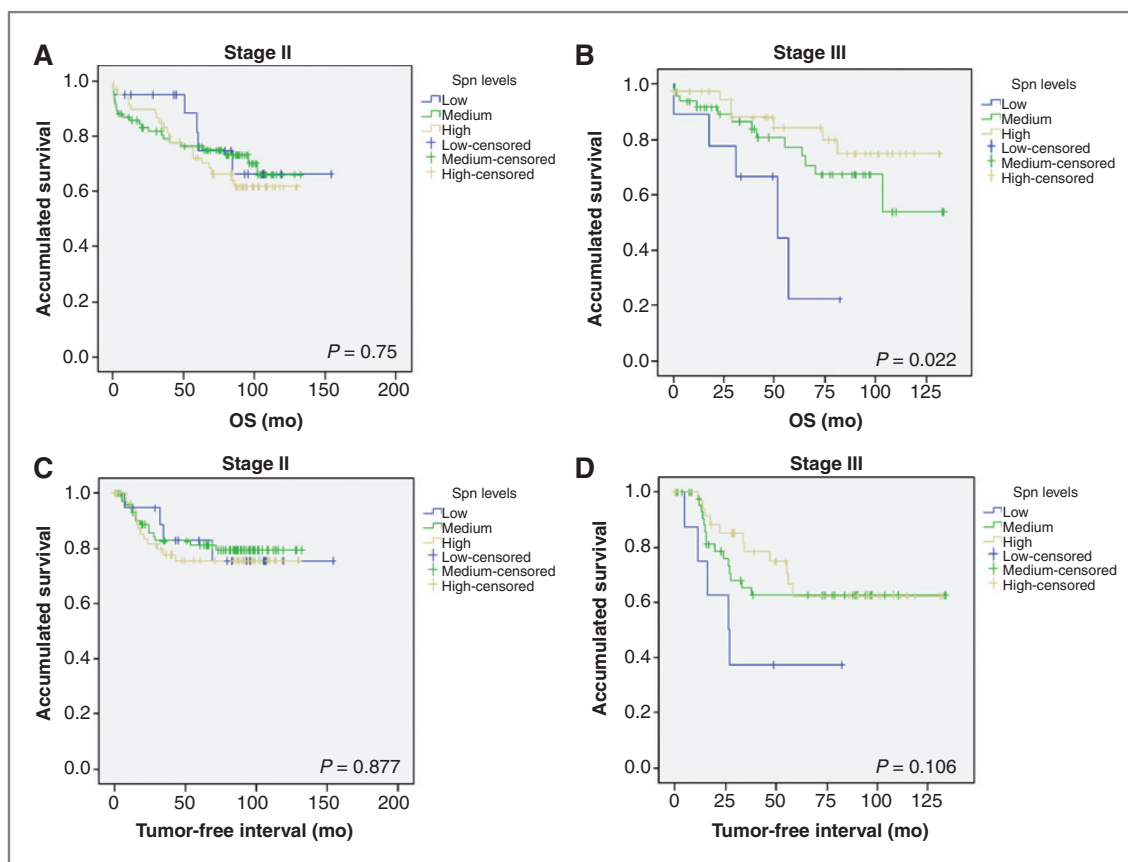


Figure 4. Kaplan-Meier curves of OS (A and B graphs) or DFI (C and D) according to Spn levels. The analysis is grouped by tumor stage. A and B, OS according to Spn levels is shown. The log-rank test showed a nonsignificant correlation ( $\chi^2 = 0.575$ ;  $P = 0.75$ ) for stage II patients, while showing a significant correlation for stage III tumor patients ( $\chi^2 = 7.677$ ;  $P = 0.022$ ). C and D, DFI according to Spn levels was analyzed. The log-rank test showed a nonsignificant correlation ( $\chi^2 = 0.263$ ;  $P = 0.877$ ) for stage II patients, while showing a borderline significant correlation for stage III patients ( $\chi^2 = 4.487$ ;  $P = 0.106$ ). Spn levels are as follows: low,  $<100$ ; medium,  $100 \leq <200$ ; high,  $\geq 200$ .

with colorectal carcinoma showed that patients with stage III colorectal carcinoma with low levels of Spn exhibited lower survival and faster relapse, particularly in those receiving adjuvant therapy. Moreover, in this subset of patients, low Spn expression significantly predicted a poorer survival independent of other relevant prognostic factors such as age or having received adjuvant chemotherapy. We validated this result in an independent cohort of patients with mCRC. Although patients achieving an objective radiologic response to chemotherapy had Spn levels similar to those of nontumoral tissue, nonresponder patients showed a significant reduction of Spn mRNA levels. In this independent cohort of patients with metastatic disease, our study also revealed that low Spn expression levels were associated with a shorter progression-free survival and a higher risk of death.

The Spn gene is located in chromosome 17 at position 17q21.33. This genomic region contains a relatively high density of tumor suppressor genes including the known

(BRCA1, NME1), the putative (JUP, prohibitin), and unidentified candidates distal to the BRCA1 locus. This area is frequently associated with microsatellite instability and LOH. The fraction of tumor samples in the cohort analyzed in our work with low (less than 0.5 in tumor/normal) or no Spn expression is approximately of 25%, which is in good agreement with previous reports assessing the allelic imbalance of this region (10–13).

Most of the studies on the 17q21 locus have focused on BRCA1, which exhibits a variable frequency in LOH (25–27). The relevant data regarding spinophilin LOH came from a study on primary lung carcinoma (28). Extensive LOH mapping in human lung cancers involved 15 highly polymorphic markers, seven of which span the 17q11–24 region. The higher LOH value appeared with the D17S588 marker, which showed a 53% loss. The D17S588 marker locates exactly within the spinophilin locus at 45.57 Mb (28). This association seems to be specific because closer tumor suppressor genes, such as BRCA1, were not seriously affected

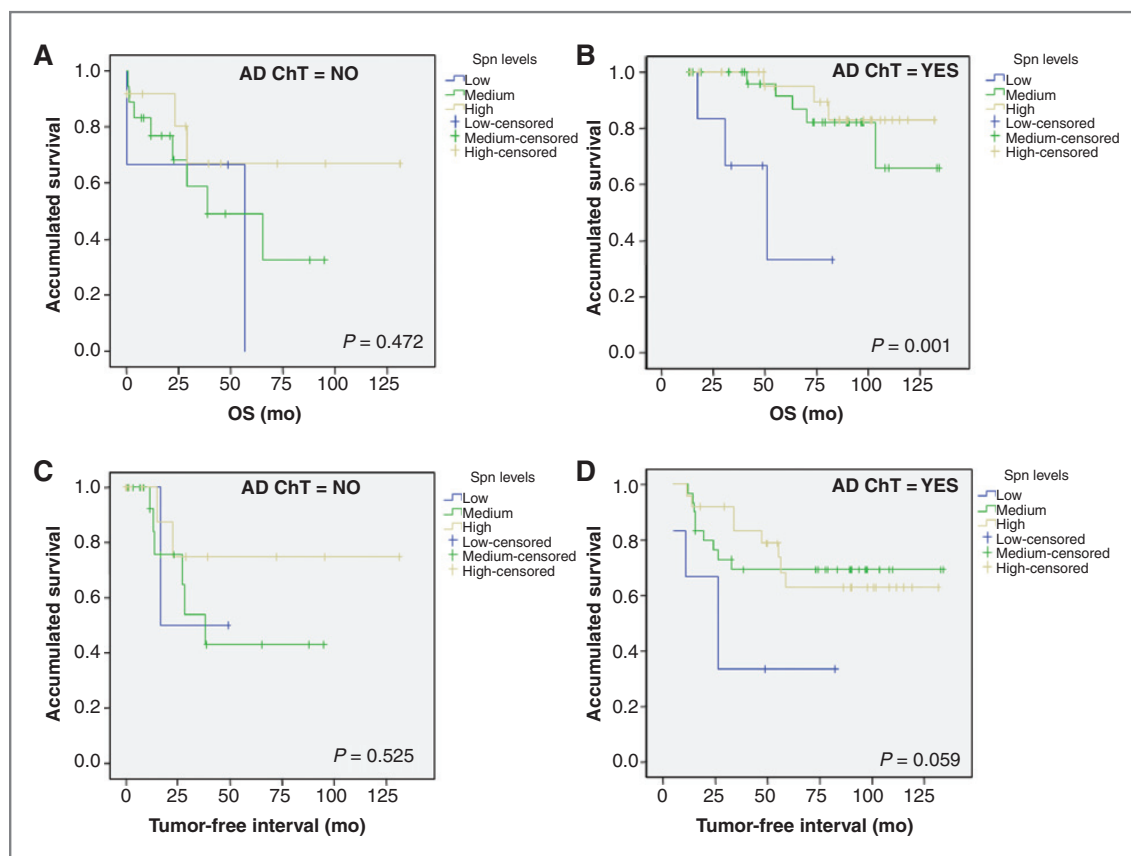


Figure 5. Kaplan-Meier curves of OS (A and B graphs) or DFI (C and D graphs) with or without adjuvant chemotherapy according to Spn levels in patients with stage III colorectal carcinoma. The analysis only shows stage III as all correlations in stage II were not significant. A, OS according to Spn levels in patients without adjuvant chemotherapy. B, OS according to Spn levels in patients treated with adjuvant chemotherapy. C, DFI according to Spn levels in patients without adjuvant chemotherapy. D, DFI according to Spn levels in patients treated with adjuvant chemotherapy. The log-rank test showed a nonsignificant correlation for OS ( $P = 0.525$ ) or DFI ( $P = 0.472$ ) for patients not treated with adjuvant chemotherapy, while showing a significant correlation for stage III tumor patients treated with adjuvant chemotherapy in OS ( $P = 0.001$ ) or DFI ( $P = 0.059$ ). Spn levels are as follows: low,  $<100$ ; medium,  $100 \leq x < 200$ ; high,  $\geq 200$ .

(6%–13% LOH). Furthermore, several genetic linkage studies have suggested the existence of a tumor suppressor gene distal to *BRCA1* (29, 30), indicating the importance of this locus in cancer pathology. LOH in chromosome 17q21.3, not linked to *BRCA1*, has been observed in different tumors, including colorectal, gastric, and lung carcinomas (14). The analysis of *BRCA1* in our samples indicates that this gene does not influence the response to treatment in patients with mCRC, highlighting the relevance of Spn gene in 17q21 LOH.

However, in addition to *Spn*, the *NME1* gene, which has also been proposed as a tumor suppressor candidate, maps to this location. After its isolation, *NME1* was described as a putative metastasis-suppressor gene on the basis of its reduced expression in murine melanoma cell lines with high metastatic potential. However, the implications of *NME1* in cancer are still not clear and may have distinct, if not opposite roles, in different tumors.

As published in previous works (22), loss of Spn induces a molecular response very similar to that described in oncogen-induced senescence. This effect seems to be due to the inactivation of pRb which lead to E2F1 activation, p14ARF transcription, and consequently p53 activation. In this context, inactivation of p53 allows cells with lower levels of Spn to bypass senescence. This has been shown in mice (23) and in human lung tumors (15). We have data that this functional relationship between Spn loss and p53 mutations also exists in other tumors such as stomach tumors (data not shown). However, this functional correlation was not observed in stage II/III colorectal carcinomas. In colorectal carcinomas K-ras and B-Raf mutations, which occur in around 45% and 5% to 10% of tumors, are relative early events in the tumorigenic process (8, 31). Because oncogenic Ras or B-Raf also induce a senescence response, it is plausible that Kras- or B-Raf-mutated tumors need to bypass senescence

**Table 1.** Multivariate analysis for stage III tumors

	<i>P</i>	HR (95% CI)
DFI		
Adj-CT	0.253	1.676 (0.691–4.063)
SPN	0.068	0.594 (0.339–1.040)
Age	0.341	0.985 (0.954–1.017)
OS		
Adj-CT	0.002	4.722 (1.793–12.433)
SPN	0.019	0.453 (0.234–0.877)
Age	0.946	1.001 (0.961–1.043)

NOTE: Statistics were assessed with COX regression model. Abbreviations: Adj-CT, adjuvant chemotherapy; CI: confidence interval.

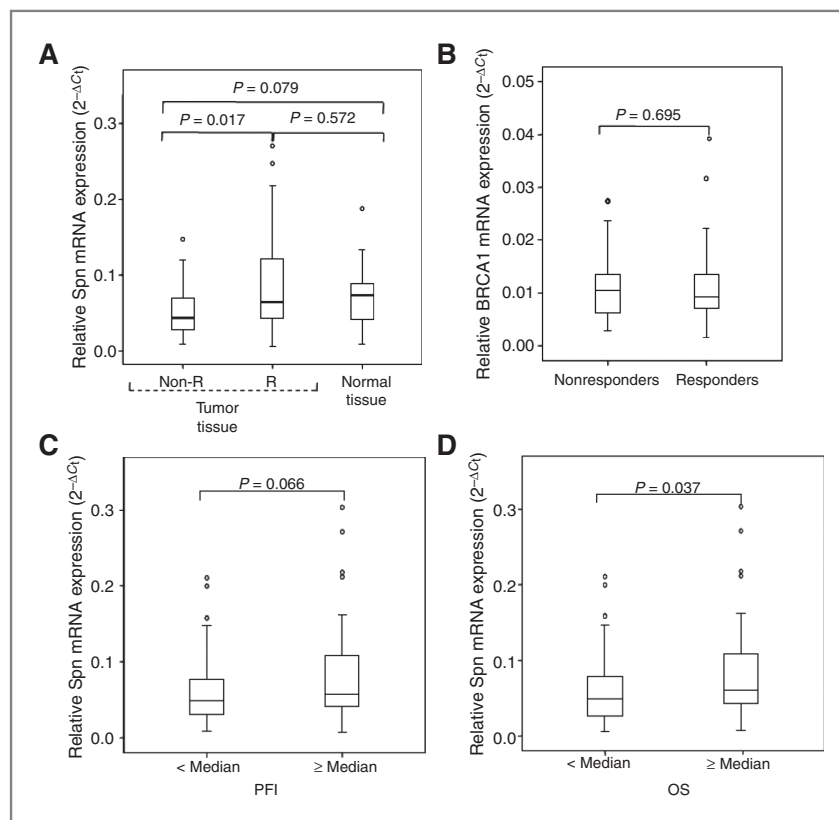
to progress, and that this might occur by genetic alterations other than p53 mutations (i.e., p14ARF methylation or INK4 locus loss). Because Spn loss seems to be a late event, when this happens the senescence barrier is bypassed with no need for further p53 mutations to occur. This hypothesis therefore suggests that the corre-

lation between Spn loss and mutations in p53 is dependent on the molecular context.

The literature relating loss-of-function of tumor suppressors and apparition of chemoresistance is large. Either by inactivating mutations such as the case of p53 or PTEN, allelic loss (i.e., PTEN or the INK4a locus), by postraslational modifications leading to misslocalization (i.e., Foxo3A or p27kip1), or by promoter hypermethylation (i.e., p73, MLH1, or Apaf1), the loss-of-function of many tumor suppressors has been consistently related to decreased survival or tumor response in the presence of chemotherapeutic drugs *in vitro* and *in vivo*. The mechanisms through which they induce resistance have also been unraveled in many cases (32, 33). Recently, the down-regulation of microRNAs have been also described playing a role in chemoresistance. For example, loss of miR-181a and miR-630 expressions might inhibit cisplatin-induced cancer cell death in non-small cell lung carcinoma (34).

A large number of antineoplastic agents rely on DNA-damage as the main mechanism of action for cytotoxicity. Indeed, such is the case for the 3 commonly used agents in colorectal carcinoma, 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan, and oxaliplatin (35). Mutations in the DNA mismatch repair genes MLH1 and MSH2 are associated to resistance to DNA-damaging agents (36). Cisplatin resistance has been

Figure 6. The correlation of gene expression of Spn (A) or Brca1 (B) with response in mCRC. PFI (C) and OS (D) according to Spn mRNA levels. Spn expression levels were normalized to GAPDH in tumor tissue of nonresponders and responders to chemotherapy and in normal colon tissue located near the tumor. The differences between the groups were tested using the *t* test. R, responders; non-R, nonresponders.



attributed to defects in the mismatch repair mechanism due to hypermethylation of the MLH1 promoter (37). Interestingly, cell lines resistant to cisplatin remain sensitive to oxaliplatin (38), which is attributed to the different DNA-adducts formed by the two drugs (39). P53 is a sensor of DNA-damage launching the appropriate cellular response, arrest, apoptosis, or senescence.

The tumor suppressor p53 is mutated in approximately 50% of human cancers and its function is compromised by different mechanisms in most tumors with wild-type p53 (40). Lack of functional p53 contributes to drug resistance likely due to the inability to undergo apoptosis. For example, loss of p53 function correlated to decreased sensitivity to 5-FU and oxaliplatin but not to irinotecan- nor paclitaxel-based therapies (41). Furthermore, data from clinical trials suggest that doxorubicin is more active in p53-wild-type cancers. Spn could contribute to oxaliplatin and 5-FU resistance by regulating p53 phosphorylation and activity which is regulated by PP1 (42). However more work is necessary to confirm this hypothesis. Disruption of apoptosis downstream p53 may also contribute to chemoresistance (40, 41). However, while p53 mutations contribute to resistance to chemo- and radiotherapy, BRCA1/2 dysfunction leads to increased sensitivity to DNA-damaging agents in breast and ovarian tumors (43, 44). Other p53 family members, p73 and p63, have been related to chemoresistance by different mechanisms (45).

Also, activation of AKT, which may occur by activation of tyrosine kinase receptors, PI3Ks or Ras, or inactivation of the tumor suppressor PTEN or proapoptotic proteins also has been related in many cases to chemoresistance in solid tumors. Some of these targets are regulated by PP1, such as PTEN, AKT, Bad, Bax, or BRCA1 (42, 46) and therefore, Spn may contribute to resistance by indirectly targeting some of these targets to the phosphatase. More work is warranted to confirm the mechanism of resistance involved.

In summary, our data show for the first time that the protein spinophilin, Spn, has prognostic and predictive value for advanced stages of colorectal carcinoma. Together

with other reports on Spn (17–20, 22), our data suggest that the scaffolding protein Spn is important for the regulation of PP1a and pRb and that its absence may contribute to tumorigenesis in colorectal carcinomas. Mechanistically, the loss of Spn may induce a proliferative response by increasing pRb phosphorylation, which may influence the malignant phenotype and contribute to the failure of therapy in advanced stages of colorectal carcinoma.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Authors' Contributions

**Conception and design:** L. Paz-Ares, A. Carnero

**Development of methodology:** A. Lucena-Cacace, L. Paz-Ares

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** P. Estevez-Garcia, I. Lopez-Calderero, S. Molina-Pinelo, S. Muñoz-Galvan, A. Salinas, L. Gomez-Izquierdo, B. Felipe-Abrio, L. Paz-Ares, A. Carnero

**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** P. Estevez-Garcia, I. Lopez-Calderero, S. Molina-Pinelo, L. Paz-Ares, R. Garcia-Carbonero, A. Carnero

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** P. Estevez-Garcia, I. Lopez-Calderero, L. Paz-Ares, R. Garcia-Carbonero, A. Carnero

**Study supervision:** A. Carnero

#### Acknowledgments

The authors thank the Biobank from Hospital Virgen del Rocio for providing the human samples required for this study.

#### Grant Support

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2009-08605), Fondo de Investigacion Sanitaria (PI12/00137), Consejería de Ciencia e Innovacion, and Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (CTS-6844 and PI-0142). A. Carnero's laboratory is also funded by a fellowship from Fundacion Oncologica FERO. P. Estevez-Garcia and I. Lopez-Calderero are supported by Rio Ortega Fellowships and S. Molina-Pinelo is supported by a Sara Borrell fellowship. R. Garcia-Carbonero is funded by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, Spain (PI 10.02164).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received January 14, 2013; revised May 2, 2013; accepted May 17, 2013; published OnlineFirst May 31, 2013.

#### References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
- Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004;23:6329–40.
- Cunningham D, Sirohi B, Pluzanska A, Utracka-Hutka B, Zaluski J, Glynn-Jones R, et al. Two different first-line 5-fluorouracil regimens with or without oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009;20:244–50.
- de Gramont A, Figer A, Seymour M, Hommerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2938–47.
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:905–14.
- Sedivy R, Wolf B, Kalipciyan M, Steger GG, Karner-Hanusch J, Mader RM. Genetic analysis of multiple synchronous lesions of the colon adenoma-carcinoma sequence. *Br J Cancer* 2000;82:1276–82.
- Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007;318:1108–13.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:489–99.
- Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011;6:479–507.
- Lamb RF, Going JJ, Pickford I, Birnie GD. Allelic imbalance at NME1 in microdissected primary and metastatic human colorectal carcinomas is frequent but not associated with metastasis to lymph nodes or liver. *Cancer Res* 1996;56:916–20.
- Gao X, Porter AT, Honn KV. Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 1997;407:41–53.
- Garcia-Patino E, Gormendio B, Leonart M, Silva JM, Garcia JM, Provencio M, et al. Loss of heterozygosity in the region including the BRCA1 gene on 17q in colon cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;104:119–23.

13. Yu J, Zhou H, Jin Y, Bai J, Yu Y, Geng J, et al. Three distinct regions of allelic deletion on chromosome 17 involved in sporadic gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2008;55:1487-91.
14. Carnero A. Spinophilin: a new tumor suppressor at 17q21. *Curr Mol Med* 2012;12:528-35.
15. Molina-Pinelo S, Ferrer I, Blanco-Aparicio C, Peregrino S, Pastor MD, Alvarez-Vega J, et al. Down-regulation of spinophilin in lung tumours contributes to tumorigenesis. *J Pathol* 2011;225:73-82.
16. Allen PB, Ouimet CC, Greengard P. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:9956-61.
17. Satoh A, Nakanishi H, Obaishi H, Wada M, Takahashi K, Satoh K, et al. Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J Biol Chem* 1998;273:3470-5.
18. Vivo M, Calogero RA, Sansone F, Calabro V, Parisi T, Borrelli L, et al. The human tumor suppressor arf interacts with spinophilin/neurabin II, a type 1 protein-phosphatase-binding protein. *J Biol Chem* 2001;276:14161-9.
19. Hsieh-Wilson LC, Allen PB, Watanabe T, Nairn AC, Greengard P. Characterization of the neuronal targeting protein spinophilin and its interactions with protein phosphatase-1. *Biochemistry* 1999;38:4365-73.
20. Ouimet CC, Katona I, Allen P, Freund TF, Greengard P. Cellular and subcellular distribution of spinophilin, a PP1 regulatory protein that bundles F-actin in dendritic spines. *J Comp Neurol* 2004;479:374-88.
21. Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, et al. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9287-92.
22. Ferrer I, Blanco-Aparicio C, Peregrina S, Canamero M, Fominaya J, Cecilia Y, et al. Spinophilin acts as a tumor suppressor by regulating Rb phosphorylation. *Cell Cycle* 2011;10:2751-62.
23. Ferrer I, Peregrino S, Canamero M, Cecilia Y, Blanco-Aparicio C, Carnero A. Spinophilin loss contributes to tumorigenesis *in vivo*. *Cell Cycle* 2011;10:1948-55.
24. Ruiz L, Traskine M, Ferrer I, Castro E, Leal JF, Kaufman M, et al. Characterization of the p53 response to oncogene-induced senescence. *PLoS One* 2008;3:e3230.
25. Querzoli P, Albonico G, di lasio MG, Ferretti S, Rinaldi R, Cariello A, et al. Biophenotypes and survival of BRCA1 and TP53 deleted breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat* 2001;66:135-42.
26. Caduff RF, Svoboda-Newman SM, Ferguson AW, Frank TS. Comparison of alterations of chromosome 17 in carcinoma of the ovary and of the breast. *Virchows Arch* 1999;434:517-22.
27. Maitra A, Tavassoli FA, Albores-Saavedra J, Behrens C, Wistuba II, Bryant D, et al. Molecular abnormalities associated with secretory carcinomas of the breast. *Hum Pathol* 1999;30:1435-40.
28. Abujiang P, Mori TJ, Takahashi T, Tanaka F, Kasyu I, Hitomi S, et al. Loss of heterozygosity (LOH) at 17q and 14q in human lung cancers. *Oncogene* 1998;17:3029-33.
29. Porter DE, Cohen BB, Wallace MR, Smyth E, Chetty U, Dixon JM, et al. Breast cancer incidence, penetrance and survival in probable carriers of BRCA1 gene mutation in families linked to BRCA1 on chromosome 17q12-21. *Br J Surg* 1994;81:1512-5.
30. Smith SA, Easton DF, Ford D, Peto J, Anderson K, Averill D, et al. Genetic heterogeneity and localization of a familial breast-ovarian cancer gene on chromosome 17q12-q21. *Am J Hum Genet* 1993;52:767-76.
31. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006;314:268-74.
32. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;31:1869-83.
33. Ali AY, Farrand L, Kim JY, Byun S, Suh JY, Lee HJ, et al. Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1271:58-67.
34. Galluzzi L, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Senovilla L, Criollo A, et al. miR-181a and miR-630 regulate cisplatin-induced cancer cell death. *Cancer Res* 2010;70:1793-803.
35. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991;51:6304-11.
36. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 1998;4:1-6.
37. Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 2000;60:6039-44.
38. Raymond E, Lawrence R, Izbicka E, Faivre S, Von Hoff DD. Activity of oxaliplatin against human tumor colony-forming units. *Clin Cancer Res* 1998;4:1021-9.
39. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53:3-11.
40. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.
41. Wilson TR, Longley DB, Johnston PG. Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol* 2006;17(Suppl 10):x315-24.
42. Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, Hasegawa T, Nakashima I, Isobe K. Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53. *FEBS Lett* 2004;567:171-4.
43. Wang W, Figg WD. Secondary BRCA1 and BRCA2 alterations and acquired chemoresistance. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1004-5.
44. Scata KA, El-Deiry WS. p53, BRCA1 and breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol* 2007;608:70-86.
45. Gasco M, Crook T. p53 family members and chemoresistance in cancer: what we know and what we need to know. *Drug Resist Updat* 2003;6:323-8.
46. Esteves SL, Domingues SC, da Cruz e Silva OA, Fardilha M, da Cruz e Silva EF. Protein phosphatase 1alpha interacting proteins in the human brain. *OMICS* 2012;16:3-17.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# MiR-107 and miR-99a-3p predict chemotherapy response in patients with advanced colorectal cancer

Sonia Molina-Pinelo<sup>1</sup>, Amancio Carnero<sup>1</sup>, Fernando Rivera<sup>2</sup>, Purificacion Estevez-Garcia<sup>1</sup>, Juan Manuel Bozada<sup>3</sup>, Maria Luisa Limon<sup>4</sup>, Marta Benavent<sup>1</sup>, Javier Gomez<sup>5</sup>, Maria Dolores Pastor<sup>1</sup>, Manuel Chaves<sup>4</sup>, Rocio Suarez<sup>1</sup>, Luis Paz-Ares<sup>1,4</sup>, Fernando de la Portilla<sup>6</sup>, Andres Carranza-Carranza<sup>1</sup>, Isabel Sevilla<sup>7</sup>, Luis Vicioso<sup>8</sup> and Rocio Garcia-Carbonero<sup>1,4\*</sup>

## Abstract

**Background:** MicroRNAs (miRNAs) are involved in numerous biological and pathological processes including colorectal cancer (CRC). The aim of our study was to evaluate the ability of miRNA expression patterns to predict chemotherapy response in a cohort of 78 patients with metastatic CRC (mCRC).

**Methods:** We examined expression levels of 667 miRNAs in the training cohort and evaluated their potential association with relevant clinical endpoints. We identified a miRNA profile that was analysed by RT-qPCR in an independent cohort. For a set of selected miRNAs, bioinformatic target predictions and pathway analysis were also performed.

**Results:** Eight miRNAs (let-7 g\*, miR-107, miR-299-5p, miR-337-5p, miR-370, miR-505\*, miR-889 and miR-99a-3p) were significant predictors of response to chemotherapy in the training cohort. In addition, overexpression of miR-107, miR-337-5p and miR-99a-3p, and underexpression of miR-889, were also significantly associated with improved progression-free and/or overall survival. MicroRNA-107 and miR-99a-3p were further validated in an independent cohort as predictive markers for chemotherapy response. In addition, an inverse correlation was confirmed in our study population between miR-107 levels and mRNA expression of several potential target genes (CCND1, DICER1, DROSHA and NFKB1).

**Conclusions:** MiR-107 and miR-99a-3p were validated as predictors of response to standard fluoropyrimidine-based chemotherapy in patients with mCRC.

**Keywords:** MicroRNAs, Advanced colorectal cancer, Chemotherapy response, Prediction

## Background

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumors worldwide [1]. Despite advances in early detection, about one third of patients present metastatic disease at diagnosis, and ~40% of those with early-stage tumors eventually relapse at some point over the course of the disease [2]. Systemic therapy is the mainstay of care

for patients with metastatic CRC (mCRC) [3]. Several combination regimens including fluoropyrimidines and oxaliplatin and/or irinotecan, with or without monoclonal antibodies targeting VEGF or EGFR, have been successfully developed and are associated with response rates of 40-60% and a median survival of 20–24 months [4-9]. Despite the undeniable progress achieved, still a considerable proportion of patients do not respond to therapy and reliable tools to prospectively identify which patients are more likely to benefit are needed.

Several driver mutations have been identified to be relevant in CRC carcinogenesis [10,11]. The most commonly involved pathways include the Wnt/ $\beta$ -catenin,

\* Correspondence: rgcarbonero@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocio/CSIC/Universidad de Sevilla, Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain

<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Virgen del Rocio, Avda. Manuel Siurot s/n, Sevilla, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



TGF- $\beta$ /BMP, TP53, receptor tyrosine kinase, KRAS and PI3K signaling pathways [10]. Many of these proteins are altered and seem to be affected by microRNA regulation. In this sense, the miR-135 family may play an important role in early CRC development as it down-regulates APC, leading to activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [12]. On the other hand, the lethal-7 (let-7) family of miRNAs has been found to display tumor suppressor functions by repressing translation of KRAS. Interestingly, patients with KRAS-mutated CRC and high let-7 levels seem to benefit from EGFR-targeted agents, suggesting that let-7 expression could potentially counteract resistance mediated by RAS activating mutations [13]. KRAS has been also described to be a direct target of other miRNAs such as miR-143, miR-146b-3p, miR-18a, and miR-486-5p [14-17] and miR-126 has been implicated in PI3K signaling [18]. Other miRNAs known to be involved in CRC pathogenesis affect epithelial differentiation (miR-141 and miR-200c), WNT signaling (miR-145, miR-135a and miR-135b), and migration and invasion (miR-21, miR-373 and miR-520c) [19-22].

From a clinical perspective, several studies have identified groups of miRNAs with potential utility for early diagnosis or prognostic stratification of CRC patients. However, there are no robust studies to evaluate the potential ability of miRNA to predict response to selected chemotherapy regimens. Based on these premises, the purpose of this study was to evaluate the ability of miRNA expression patterns to predict chemotherapy response in patients with mCRC treated with fluoropyrimidine-based standard chemotherapy regimens.

## Methods

### Patients and tumor samples

Patients that met the following inclusion criteria were selected for the present study: (1) histologically confirmed diagnosis of primary CRC; (2) TNM stage IV; (3) fluoropyrimidine-based first-line chemotherapy for advanced disease; (4) measurable disease per RECIST criteria; (5) adequate clinical data recorded in medical charts; (6) adequate tissue specimen available (snap-frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  with a proportion of tumor cells  $> 50\%$ ). This study was approved by the ethics committees of Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla), Hospital Marques de Valdecilla (Santander) and Hospital Virgen de la Victoria (Malaga), and all patients provided written informed consent prior to study entry.

Tumor tissue samples of 78 patients were collected at the Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla), Hospital Marques de Valdecilla (Santander), Hospital Virgen de la Victoria (Malaga) and Hospital de la Merced (Osuna). Main characteristics of study population are summarized in Table 1 and are representative of a standard metastatic CRC population. The majority of patients (96%) were

**Table 1 Characteristics of study population**

	Training cohort (N = 39)	Validation cohort (N = 39)
<b>Age, years – median [range]</b>	62 [54–70]	66 [61–72]
<b>Gender - N(%)</b>		
Male	23 (59.0%)	29 (74.4%)
Female	16 (41.0%)	10 (25.6%)
<b>Histology of primary tumor - N(%)</b>		
Adenocarcinoma	35 (89.7%)	39 (100%)
Mucinous adenocarcinoma	4 (10.3%)	-
<b>Chemotherapy regimen - N(%)</b>		
Ox/FP regimens	30 (76.9%)	29 (74.3%)
Ir/FP regimens	7 (17.9%)	9 (23.1%)
FP monotherapy	2 (5.2%)	1 (2.6%)
<b>Response to chemotherapy - N(%)</b>		
Objective Response (CR, PR)	18 (46.2%)	24 (61.5%)
No Response (SD, PD)	21 (53.8%)	15 (38.5%)
<b>Survival, months – median [range]</b>		
Progression-free survival	12.2 [6.3-18.9]	11.6 [8.6-18.3]
Overall survival	24.6 [15.8-37.2]	21.5 [13.3-31.1]

Continuous variables are expressed as median [interquartile range (IQR)] and categorical variables as number of cases (%). Ox: oxaliplatin; FP: fluoropyrimidine; Ir: Irinotecan. CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progressive disease.

treated with a chemotherapy regimen that included fluoropyrimidines and either oxaliplatin (76%) or irinotecan (20%). The patient population was divided in a training cohort (N = 39) that was used for miRNA profile development and an independent validation cohort (N = 39).

### Clinical outcome variables and statistical analysis

Descriptive statistics were used to characterize the most relevant clinical parameters. The association of categorical variables was explored by the chi-squared test or Fisher's exact test. To assess distribution of continuous variables among study groups parametric (t-test) or non-parametric tests (Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests) were employed when appropriate.

Tumor response was evaluated by conventional methods according to the standard RECIST 1.0 criteria: a complete response (CR) was defined as the disappearance of all measurable and evaluable evidence of disease; a partial response (PR) was defined as a  $\geq 30\%$  decrease in the sum of the longest diameters of target lesions; stable disease (SD) was considered if the tumor burden decreased less than 30% or increased less than 20%; and progressive disease (PD) was indicated by a  $>20\%$  increase in the sum of the longest diameters of target lesions or the appearance of any new lesion. Patients were classified according to

best response to chemotherapy in two groups: those that achieved an objective response (Responders [R]: CR + PR) and those that did not (Non-responders [NR]: SD + PD). Progression Free Survival (PFS) was defined as the time elapsed from the date of initiation of first-line chemotherapy to the date of the first documented evidence of disease progression. Overall survival (OS) was calculated from the start of therapy for advanced disease to the date of death from any cause. The Kaplan-Meier product limit method was used to estimate time-dependent variables (PFS and OS), and differences observed among patient subgroups were assessed by the log rank test. Multivariate analyses were performed using the Cox proportional hazards model.  $P < 0.05$  was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 17.0 for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL).

#### RNA isolation and miRNA qRT-PCR assay

Total RNA, containing small RNA, was extracted from tumor tissue samples by mirVana miRNA isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. Mature human miRNA expression was detected and quantified using the TaqMan® Low Density Arrays (TLDA) based on Applied Biosystems' 7900 HT Micro Fluidic Cards (Applied Biosystems, CA, USA) following instructions provided by the manufacturer. The Human MicroRNA Card Set v2.0 array is a two card set containing a total of 384 TaqMan® MicroRNA Assays per card to enable accurate quantification of 667 human microRNAs, all catalogued in the miR-Base database. TLDA were performed in a two-step process, as previously described [23].

Eight miRNAs (let-7 g\*, miR-107, miR-299-5p, miR-337-5p, miR-370, miR-505\*, miR-889 and miR-99a-3p), which were selected because their expression in the Taqman Low Density Array card assays was significantly associated with response to chemotherapy and clinical outcome, were further analyzed in an independent validation cohort by qPCR. For this, RNA was reverse transcribed to cDNA using TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems, CA, USA). Ten ng of total RNA were reverse transcribed using the TaqMan miRNA reverse transcription kit in a total volume of 15  $\mu$ l, according to the manufacturer's protocol. The reactions were incubated for 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, and 5 min at 85°C, and then kept at 4°C. Thereafter, 1.33  $\mu$ l of cDNA was used for TaqMan MicroRNA Assays. The reactions were incubated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. All experiments were performed in triplicate.

#### Analysis of miRNA expression profiles

Expression of target miRNAs was normalized to the expression of MammU6, the most widely-used endogenous

miRNA control for RT-qPCR in the literature. One non-human miRNA was used in each experiment as a negative control. Finally, the cards were processed and analyzed on an ABIPrism 7900 HT Sequence Detection System. Cycle threshold (Ct) values were calculated with the SDS software v.2.3 using automatic baseline settings and a threshold of 0.2. Relative quantification of miRNA expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Applied Biosystems user bulletin no.2 (P/N 4303859)). MicroRNAs expression was computed using Real-Time Statminer® software v.4.2 (Integromics, Inc). This software performs a moderate t-test between the groups (R versus NR) and corrects them using the Benjamini-Hochberg algorithm with the False Discovery Rate (FDR) set at a value of 5%. For undetected miRNAs with Ct values beyond the maximum Ct 36, the StatMiner software imputed a value set to the maximum Ct. For the purpose of this study, significant miRNA expression was considered only when miRNAs were detected in at least 50% of samples in each group being compared. The raw and normalized TaqMan array data have been deposited in the Gene Expression Omnibus under the accession number GSE48664.

Experimentally verified mRNA by previous research were determined using the web-accessible information resource miRWalk [24]. We then validated 9 potential target genes according to expression levels of miR-107 by Taqman real-time RT-PCR assay (Applied Biosystems, CA, USA). Expression of miR-107 was normalized to the expression of MammU6. Pearson's correlation coefficient was used to assess the linear association of miRNA and target mRNA expression (SPSS 17.0 for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL).

#### 3'-UTR reporter assay for miR target validation

Confirmation of miR-107-binding to the 3'-UTR of CCDN1. HEK 293 cells at 80% confluency were co-transfected with luciferase reporter plasmids harboring the complete 3'-UTR of the desired gene (SwitchGear Genomics) along with 100nM of miR107-mimic or miRNA control (Sigma). DharmaFECT Duo (Thermo Scientific) was used as the transfection reagent in Opti-MEM (Life Technologies). Luminescence was assayed 24 hours later using Light-Switch Assay Reagents (SwitchGear Genomics) according to the manufacturer's instructions. Knockdown was assessed by calculating luciferase signal ratios for specific miRNA/non-targeting control, using empty reporter vector as control for non-specific effects. Each experiment was performed in triplicate

## Results

### MicroRNA profile development

#### MicroRNA expression patterns according to objective response to chemotherapy

The relative miRNA expression levels for patients that achieved an objective response to chemotherapy (R) versus



those that did not (NR) are represented in Additional file 1: Figure S1. Of the 667 miRNAs assessed, 7% (N = 46) were differentially expressed ( $p < 0.05$ ) among these two subgroups described (R versus NR). However, only eight of these 46 miRNAs were detected in at least 50% of tested samples (let-7 g\*, miR-107, miR-299-5p, miR-337-5p, miR-370, miR-505\*, miR-889 and miR-99a-3p) (Table 2), and were therefore considered to be representative of the general behaviour of the study population.

#### Impact of selected miRNAs expression on progression free and overall survival

These selected miRNAs able to predict response to chemotherapy were further assessed to evaluate their potential association with progression free survival (PFS) and overall survival (OS) of patients. Overall, median PFS was 13.6 months [range: 8.8-21.2] and median OS was 25.6 months [range: 17.1-39.3], consistent with survival data reported in the literature for this patient population. Kaplan-Meier estimates for PFS and OS according to miRNA expression levels grouped as above or below the median are shown in Figure 1A and B, respectively. Among tested miRNAs, expression of miR-107, miR-337-5p and miR-99a-3p was significantly associated with both PFS and OS ( $p < 0.05$ ), while that of miR-889 was only associated with OS ( $p < 0.05$ ). In addition, a trend of borderline significance was observed for miR-370 with OS ( $p = 0.094$ ).

Multivariate analyses confirmed miR-107, miR-337-5p and miR-99a-3p as independent predictive factors for PFS. Regarding overall survival, only miR-889, together with age and sex retained independent prognostic significance in the Cox multiple regression model (Table 3).

#### Independent validation

As depicted in Figure 2, miRNA expression patterns in this validation cohort were consistent with those quantified in the training cohort, in the sense that similar

association trends were observed between over- or under-expression of miRNAs and response to therapy. However, this association only achieved statistical significance for miR-107 and miR-99a-3p, with higher expression levels in mCRC patients that achieved an objective response to chemotherapy as compared to those that did not ( $p = 0.026$  and  $p = 0.027$ , respectively).

#### MicroRNA target prediction

A bioinformatic approach was used to identify experimentally verified target mRNAs of the validated miRNAs in our series, miR-107 and miR-99a-3p. However, whereas a number of genes have been experimentally validated to date for miR-107, none were identified for miR-99a-3p. Among the former, 9 of the miR-107 potential target genes were selected for further validation in our cohort, including genes involved in the PI3K/Akt signaling pathway and in the RNA-interference processing machinery. MicroRNA-107 target genes assessed were *AKT1* (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1), *CCND1* (cyclin D1), *COX8A* (cytochrome c oxidase subunit VIII), *DICER1* (dicer 1, ribonuclease type III), *DROSHA* (drosha, ribonuclease type III), *FASN* (fatty acid synthase), *FBXW7* (F-box and WD repeat domain containing 7), *NFKB1* (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1), and *TP53* (tumor protein p53). As depicted in Figure 3, an inverse correlation was observed between these nine mRNAs and miR-107 expression levels, being this correlation significant for *CCND1*, *DICER1*, *DROSHA* and *NFKB1*. Therefore, in individual tumor samples, higher levels of miR-107 were associated with lower levels of these targets. Subsequently, *CCND1* target was quantified using luciferase reporter gene assays. We observed that overexpression of miR-107 in HEK 293 cells significantly down-regulated the luciferase activity of reporter construct containing the *CCND1* 3'-UTR (Figure 4). This data indicate that miR-107 binds directly to this target RNA and inhibits its expression, further supporting a potential role for miR-107 in the regulation of these genes.

#### Discussion

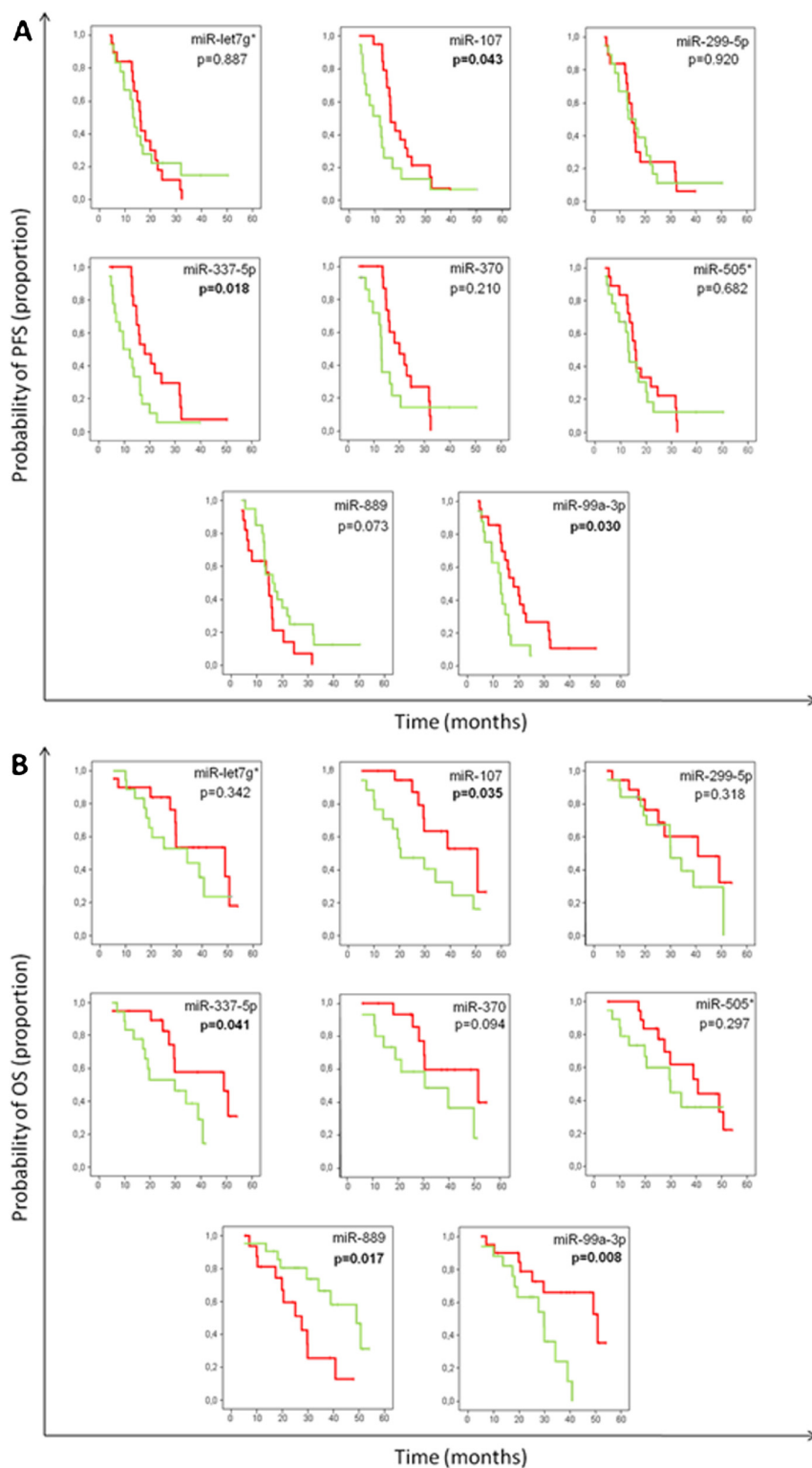
In this study, we have evaluated global miRNA expression patterns in mCRC patients treated with fluoropyrimidine-based standard chemotherapy regimens. We identified eight miRNAs (let-7 g\*, miR-107, miR-299-5p, miR-337-5p, miR-370, miR-505\*, miR-889 and miR-99a-3p), the expression of which was significantly associated with response to chemotherapy. In addition, overexpression of miR-107, miR-337-5p and miR-99a-3p, and underexpression of miR-889, were also significantly associated with improved progression-free and/or overall survival. Moreover, miR-107 and miR-99a-3p were further validated in an independent cohort as predictive markers

**Table 2 Differently expressed miRNAs by objective response to chemotherapy (Training Cohort)**

MicroRNAs	R vs NR ( $-\Delta\Delta Ct$ )	Adjusted p-values*
let-7 g*	0.863	<b>0.042</b>
miR-107	0.706	<b>0.042</b>
miR-299-5p	0.864	<b>0.006</b>
miR-337-5p	0.952	<b>0.018</b>
miR-370	1.162	<b>&lt; 0.001</b>
miR-505*	0.877	<b>0.006</b>
miR-889	-0.560	<b>0.042</b>
miR-99a-3p	0.715	<b>0.016</b>

R – responders to chemotherapy (complete or partial response); NR – non-responders to chemotherapy (stable or progressive disease) (RECIST criteria).

\*p values adjusted for multiple testing by Benjamini-Hochberg method. The bold value indicates a statistically significant result.

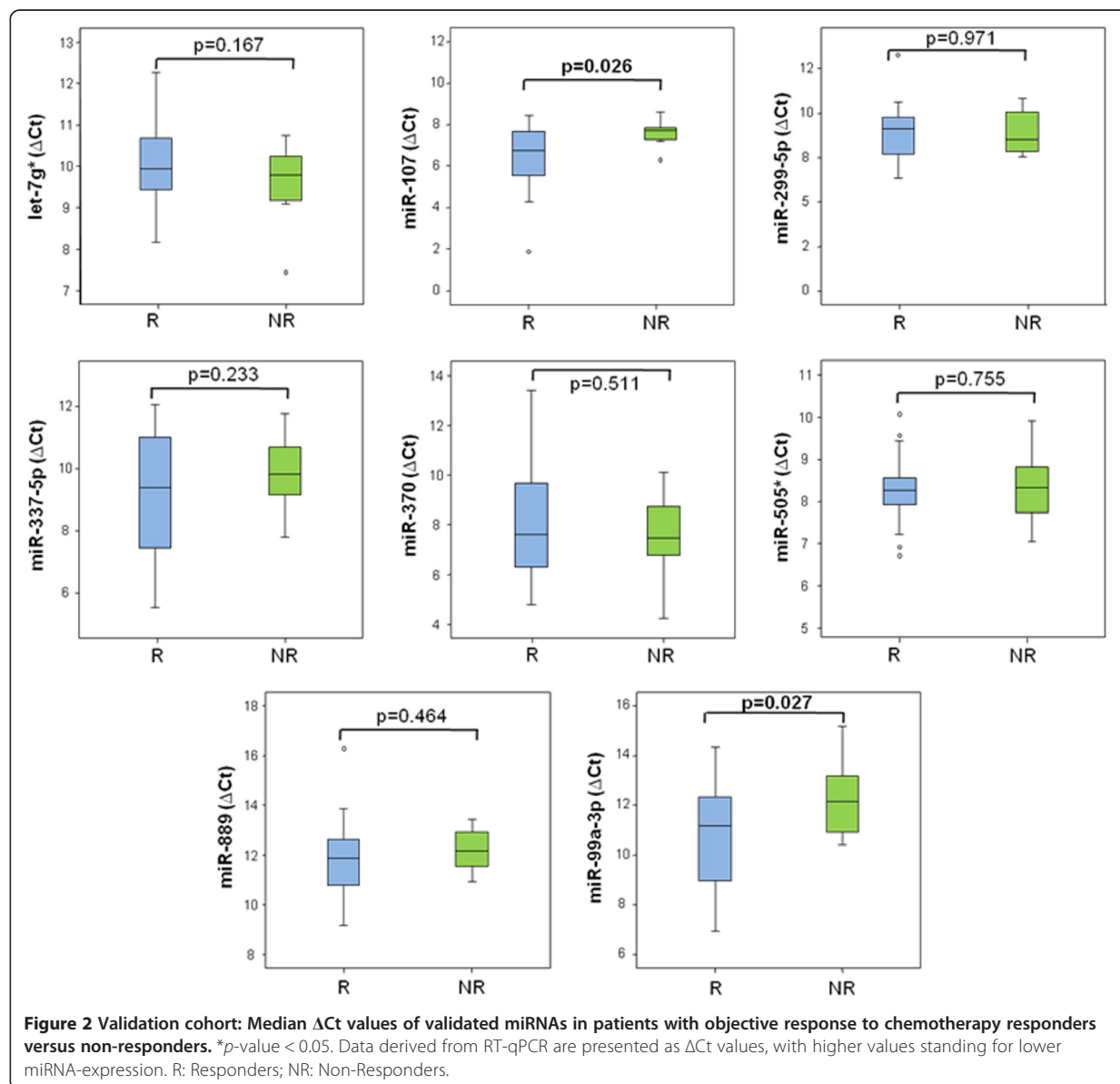


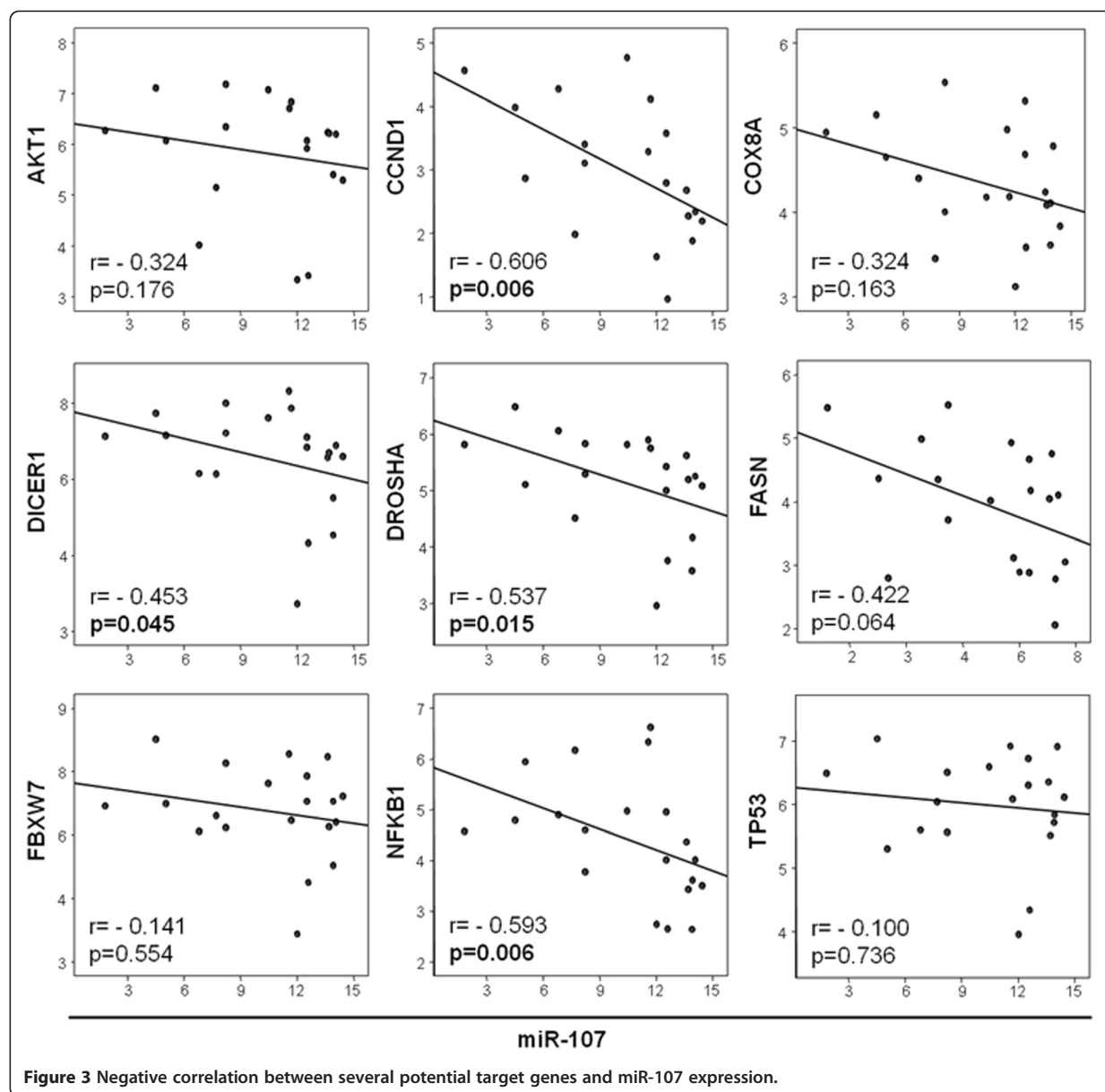
**Figure 1 Training cohort: Clinical outcome of patients by miRNA expression levels. (A)** Progression-free survival (PFS) and **(B)** Overall survival. The solid red line represents patients with higher miRNA expression levels (above the median). The solid green line represents patients with lower miRNA expression levels.

**Table 3 Univariate and multivariate analysis of predictive miRNA for PFS and OS in metastatic colorectal cancer patients (Training Cohort)**

VARIABLES	PFS				OS			
	Univariate Analysis		Multivariate Analysis		Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Age	0.99 [0.95-1.02]	0.357	0.99 [0.95-1.04]	0.765	1.01 [0.96-1.05]	0.746	1.06 [1.01-1.12]	<b>0.027</b>
Sex	0.51 [0.24-1.07]	0.069	0.60 [0.26-1.40]	0.232	0.42 [0.16-1.10]	0.069	0.17 [0.05-0.54]	<b>0.003</b>
miR-107	2.12 [1.05-4.29]	0.043	2.52 [1.18-5.42]	<b>0.017</b>	2.65 [1.06-6.67]	0.035	2.61 [0.86-7.92]	0.091
miR-337-5p	2.27 [1.12-4.58]	0.018	3.02 [1.34-6.83]	<b>0.008</b>	2.53 [0.95-6.80]	0.018	1.40 [0.42-4.69]	0.584
miR-99a-3p	2.34 [1.11-4.93]	0.030	2.50 [1.00-6.05]	<b>0.050</b>	3.46 [1.26-9.53]	0.008	1.99 [0.62-6.36]	0.243
miR-889	0.45 [0.22-0.94]	0.073	0.40 [0.16-0.90]	<b>0.027</b>	0.26 [0.10-0.71]	0.017	0.15 [0.04-0.47]	<b>0.001</b>

PFS: progression free survival; OS: overall survival; CI: confidence interval; HR: Hazard Ratio.  
 The bold value indicates a statistically significant result.

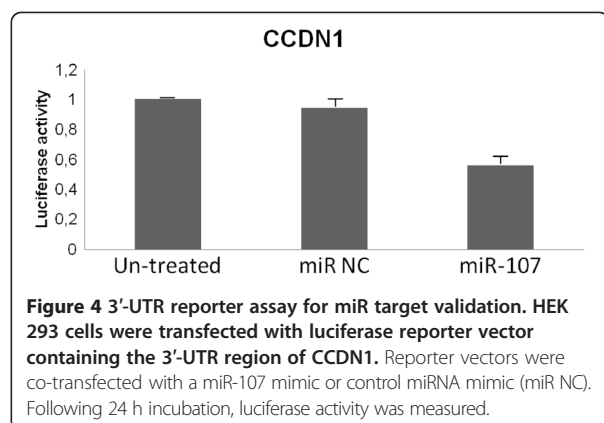




for chemotherapy response. This is to our knowledge the first study to assess the predictive role of miRNA expression profiles in patients with advanced CRC treated with fluoropyrimidines in combination with either oxaliplatin (77%) or irinotecan (18%), the most commonly used chemotherapy regimens in the treatment of this disease.

Altered miR-107 expression has been involved in several cancer types, including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), ovarian, gastric or breast cancer, among others [25-27]. Our results have demonstrated that expression of this miRNA significantly influences sensitivity to fluoropyrimidine-based chemotherapy in patients with

advanced colorectal cancer. miR-107 transcription is induced by p53 and it seems to function as a tumor suppressor gene in HNSCC cell lines through downregulation of protein kinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) [25]. PKC $\epsilon$  is elevated in HNSCC and has been associated with a more aggressive phenotype [28]. Consistent with this, other groups have reported a tumor suppressor function for miR-107 in other cancer models including bladder, colon and pancreatic cancer. With regard to human colon cancer, miR-107 has been shown to regulate tumor angiogenesis by targeting hypoxia inducible factor-1 $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ) [29]. Indeed, overexpression of miR-107 in HCT116 colon cancer cells suppressed angiogenesis, tumor growth and



tumor VEGF expression in mice. Decreased tumor angiogenesis induced by miR-107 may make tumor cells more vulnerable to a variety of cellular insults including genotoxic stress induced by DNA-damaging agents (i.e. conventional cytotoxic chemotherapy). In fact, antiangiogenic drugs such as the VEGF-targeting agents bevacizumab or aflibercept have demonstrated to be synergistic in combination with fluoropyrimidine-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. Moreover, other authors have shown that, compared with wild type tumors, tumors that lack HIF-1 $\alpha$  are poorly vascularized but are faster growing, perhaps because of a loss of dependency upon neovascularization. These findings would be consistent with the increased response rate and improved prognosis observed in our series for patients over-expressing miR-107 [30,31]. In addition, overexpression of miR-107 has been recently shown in gastric cancers in comparison with normal tissue, and up-regulation of these miRNA increased the proliferation of gastric cancer cells [32]. In colon cancer models some authors have reported that miR-103/107 may promote metastasis by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4 [33]. They also found that, in the clinical setting, the signature of a miR-103/107 high, DPAK and KLF4 low expression profile correlated with the extent of lymph node and distant metastasis. However, no information was provided this study regarding relevant characteristics of the patient population such as stage of disease or therapeutic interventions. The discrepancies observed related to miR-103/107 function could be attributed to tissue- or context-specific effects, or may simply reflect the great complexity governing intra- and inter-cellular signaling networks. On the other hand, the precise role in cancer of the other validated miRNA in our series, miR-99a-3p, remain greatly unknown to date.

To explore the potential biological function of miR-107, we then identified validated targets using the computational prediction algorithm from miRWalk [24]. *AKT1*, *CCND1*, *DICER1*, *DROSHA*, *FASN*, *FBXW7*, *NFKB1* and

*TP53* are involved in several key pathways relevant to cancer such as the PI3K/Akt pathway and the miRNA-processing machinery [34-39]. As expected, we confirmed in individual tumor samples of our patients an inverse correlation of these target mRNA and miR-107 expression levels, being this correlation significant for *CCND1*, *DICER1*, *DROSHA* and *NFKB1*. These results may be considered a further validation of the functional role of miR-107 in the transcriptional regulation of these key genes in cancer.

## Conclusions

Our study has identified that miR-107 and miR-99a-3p may be used to predict response to therapy with standard fluoropyrimidine-based chemotherapy regimens in patients with mCRC. These results underline the great potential of miRNAs as novel biomarkers for personalized treatment strategies and also as potential therapeutic targets. Moreover, given the fact that CRC cells may release aberrantly expressed miRNAs into peripheral blood, miRNA profiling could also have a great potential as a minimally-invasive tool for prediction or monitoring of therapeutic outcome.

## Additional file

**Additional file 1: Figure S1.** Volcano plot of differentially expressed miRNAs among responders versus non-responders to chemotherapy. The  $\log_2$  of fold change is represented on the x-axis and the negative log of p-values from the t-test is represented on the y-axis. Dots above the dashed line have a p-value < 0.05 and points below that line have a p-value > 0.05.

## Competing interests

The authors declare that they no competing interests.

## Authors' contributions

SM-P and RGC are guarantors of the paper, taking responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article. SM-P, AC, and RG-C have contributed to study design, data analysis and interpretation, drafting and revising the manuscript critically for important intellectual content. FR, PE-G, JMB, MLL, MB, JG, MDP, MC, RS, LP-A, FP, AC-C, IS, and LV have contributed to acquisition of data. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

RGC is funded by Fondo de Investigación Sanitaria (PI10/02164), Servicio Andaluz de Salud (PI-0259/2007) and RTICC (R12/0036/0028). SM-P is funded by Fondo de Investigación Sanitaria (CD1100153) and Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer. MDP is funded by Fondo de Investigación Sanitaria (CD0900148). AC lab was supported by grants to from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, ISCIII (Fis: PI12/00137, RTICC: RD12/0036/0028), Consejería de Ciencia e Innovación (CTS-6844) and Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (PI-0135-2010 and PI-0306-2012). The authors thank the donors and the Andalusian Public Health System Biobank Network (ISCIII-Red de Biobancos RD09/0076/00085) for the human tumor specimens provided for this study.

## Author details

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain.

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology, Hospital Marqués de Valdecilla, Avda. Valdecilla s/n, Santander, Spain. <sup>3</sup>Department of Gastroenterology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, Sevilla, Spain.



<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, Sevilla, Spain. <sup>5</sup>Department of Pathology, Hospital Marqués de Valdecilla, Avda. Valdecilla s/n, Santander, Spain. <sup>6</sup>Department of Surgery, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, Sevilla, Spain. <sup>7</sup>Department of Medical Oncology, Hospital Virgen de la Victoria, Lugar Arroyo Teatinos s/n, Malaga, Spain. <sup>8</sup>Department of Pathology, Hospital Virgen de la Victoria, Lugar Arroyo Teatinos s/n, Malaga, Spain.

Received: 3 February 2014 Accepted: 20 August 2014  
Published: 7 September 2014

## References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2011, **61**(2):69–90.
- Parkin DM: **International variation.** *Oncogene* 2004, **23**(38):6329–6340.
- Andre T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A: **Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(19):3109–3116.
- de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A: **Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.** *J Clin Oncol* 2000, **18**(16):2938–2947.
- Cunningham D, Sirohi B, Pluzanska A, Utracka-Hutka B, Zaluski J, Glynn-Jones R, Koralewski P, Bridgewater J, Mainwaring P, Wasan H, Wang JY, Szczylak C, Clingan P, Chan RT, Tabah-Fisch I, Cassidy J: **Two different first-line 5-fluorouracil regimens with or without oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer.** *Ann Oncol* 2009, **20**(2):244–250.
- Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P: **Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial.** *Lancet* 2000, **355**(9209):1041–1047.
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirozza N, Elfring GL, Miller LL: **Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group.** *N Engl J Med* 2000, **343**(13):905–914.
- Garcia-Carbonero R, Gomez Espana MA, Casado Saenz E, Alonso Orduna V, Cervantes Ruiperez A, Gallego Plazas J, Garcia Alfonso P, Juez Martel I, Gonzalez Flores E, Lomas Garrido M, Isla Casado D: **SEOM clinical guidelines for the treatment of advanced colorectal cancer.** *Clin Transl Oncol* 2010, **12**(11):729–734.
- Aranda E, Abad A, Carrato A, Cervantes A, Garcia-Foncillas J, Garcia Alfonso P, Garcia Carbonero R, Gomez Espana A, Tabernero JM, Diaz-Rubio E: **Treatment recommendations for metastatic colorectal cancer.** *Clin Transl Oncol* 2011, **13**(3):162–178.
- Sjoberg T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE: **The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers.** *Science* 2006, **314**(5797):268–274.
- Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezzo Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, et al: **The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers.** *Science* 2007, **318**(5853):1108–1113.
- Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R: **Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer.** *Cancer Res* 2008, **68**(14):5795–5802.
- Ruzzo A, Graziano F, Vincenzi B, Canestrari E, Perrone G, Galluccio N, Catalano V, Loupakis F, Rabitti C, Santini D, Tonini G, Fiorentini G, Rossi D, Falcone A, Magnani M: **High Let-7a MicroRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas May rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease.** *Oncologist* 2012, **17**(6):823–829.
- Ragusa M, Majorana A, Stattello L, Maugeri M, Salito L, Barbagallo D, Guglielmino MR, Duro LR, Angelica R, Caltabiano R, Biondi A, Di Vita M, Privitera G, Scalia M, Cappellani A, Vasquez E, Lanzafame S, Basile F, Di Pietro C, Purrello M: **Specific alterations of microRNA transcriptome and global network structure in colorectal carcinoma after cetuximab treatment.** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**(12):3396–3409.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: **RAS is regulated by the let-7 microRNA family.** *Cell* 2005, **120**(5):635–647.
- Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY: **Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis.** *Oncogene* 2009, **28**(10):1385–1392.
- Tsang WP, Kwok TT: **The miR-18a\* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras.** *Carcinogenesis* 2009, **30**(6):953–959.
- Guo C, Sah JF, Beard L, Willson JK, Markowitz SD, Guda K: **The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers.** *Genes Chromosomes Cancer* 2008, **47**(11):939–946.
- Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T: **A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells.** *EMBO Rep* 2008, **9**(6):582–589.
- Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimmoty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R: **The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**(2):202–210.
- Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R: **MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application.** *Mol Cancer* 2009, **8**:102.
- Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R: **Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer.** *Oncology* 2007, **72**(5–6):397–402.
- Molina-Pinelo S, Suarez R, Pastor MD, Nogal A, Marquez-Martin E, Martin-Juan J, Carnero A, Paz-Ares L: **Association between the miRNA signatures in plasma and bronchoalveolar fluid in respiratory pathologies.** *Dis Markers* 2012, **32**(4):221–230.
- Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N: **miRWalk–database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes.** *J Biomed Inform* 2011, **44**(5):839–847.
- Datta J, Smith A, Lang JC, Islam M, Dutt D, Teknos TN, Pan Q: **microRNA-107 functions as a candidate tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma by downregulation of protein kinase C $\epsilon$ .** *Oncogene* 2011, **31**(36):4045–4053.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM: **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(7):2257–2261.
- Van der Auwera I, Limame R, van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ: **Integrated miRNA and mRNA expression profiling of the inflammatory breast cancer subtype.** *Br J Cancer* 2010, **103**(4):532–541.
- Pan Q, Bao LW, Teknos TN, Merajver SD: **Targeted disruption of protein kinase C epsilon reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma.** *Cancer Res* 2006, **66**(19):9379–9384.
- Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, Hruban RH, Karim B, Mendell JT, Huso D, Lowenstein CJ: **P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(14):6334–6339.
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E: **Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis.** *Nature* 1998, **394**(6692):485–490.
- Yu JL, Rak JW, Carmeliet P, Nagy A, Kerbel RS, Coomber BL: **Heterogeneous vascular dependence of tumor cell populations.** *Am J Pathol* 2001, **158**(4):1325–1334.
- Li F, Liu B, Gao Y, Liu Y, Xu Y, Tong W, Zhang A: **Upregulation of MicroRNA-107 induces proliferation in human gastric cancer cells by targeting the transcription factor FOXO1.** *FEBS Lett* 2014, **588**(4):538–544.
- Chen RH, Chen HY, Lin YM, Chung HC, Lang YD, Lin CJ, Huang J, Wang WC, Lin FM, Chen Z, Huang HD, Shyy JY, Liang JT, Chen RH: **miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4.** *Cancer Res* 2012, **72**(14):3631–3641.
- Shimizu T, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Beeram M, Rasco DW, Smith LS, Gunn S, Smetzer L, Mays TA, Kaiser B, Wick MJ, Alvarez C, Cavazos A,

- Mangold GL, Patnaik A: The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2012, **18**(8):2316–2325.
35. Leong S, Messersmith WA, Tan AC, Eckhardt SG: Novel agents in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 2010, **16**(3):273–282.
  36. Carnero A: Novel inhibitors of the PI3K family. *Expert Opin Investig Drugs* 2009, **18**(9):1265–1277.
  37. Carnero A: The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* 2010, **16**(1):34–44.
  38. Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(7):489–501.
  39. Paz-Ares L, Blanco-Aparicio C, Garcia-Carbonero R, Carnero A: Inhibiting PI3K as a therapeutic strategy against cancer. *Clin Transl Oncol* 2009, **11**(9):572–579.

doi:10.1186/1471-2407-14-656

**Cite this article as:** Molina-Pinelo *et al.*: MiR-107 and miR-99a-3p predict chemotherapy response in patients with advanced colorectal cancer. *BMC Cancer* 2014 **14**:656.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## Gene expression profile predictive of response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer

Purificacion Estevez-Garcia<sup>1,2</sup>, Fernando Rivera<sup>3</sup>, Sonia Molina-Pinelo<sup>1</sup>, Marta Benavent<sup>1,2</sup>, Javier Gómez<sup>4</sup>, Maria Luisa Limón<sup>2</sup>, Maria Dolores Pastor<sup>1</sup>, Julia Martinez-Perez<sup>1,2</sup>, Luis Paz-Ares<sup>1,2</sup>, Amancio Carnero<sup>5</sup>, Rocio Garcia-Carbonero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevas Terapias, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) (HUVR, CSIC, Universidad de Sevilla), Sevilla, Spain

<sup>2</sup>Medical Oncology Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

<sup>3</sup>Medical Oncology Department, Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Santander, Spain

<sup>4</sup>Pathology Department, Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Santander, Spain

<sup>5</sup>Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) (HUVR, CSIC, Universidad de Sevilla), Sevilla, Spain

### Correspondence to:

Rocio Garcia-Carbonero, e-mail: rgcarbonero@gmail.com

**Keywords:** Colorectal cancer, chemotherapy, gene expression, predictive, microarray

**Received:** September 26, 2014

Accepted: January 15, 2015

Published: January 30, 2015

### ABSTRACT

**Fluoropyrimidine-based chemotherapy (CT) has been the mainstay of care of metastatic colorectal cancer (mCRC) for years. Response rates are only observed, however, in about half of treated patients, and there are no reliable tools to prospectively identify patients more likely to benefit from therapy. The purpose of our study was to identify a gene expression profile predictive of CT response in mCRC. Whole genome expression analyses (Affymetrix GeneChip® HG-U133 Plus 2.0) were performed in fresh frozen tumor samples of 37 mCRC patients (training cohort). Differential gene expression profiles among the two study conditions (responders versus non-responders) were assessed using supervised class prediction algorithms. A set of 161 differentially expressed genes in responders (23 patients; 62%) versus non-responders (14 patients; 38%) was selected for further assessment and validation by RT-qPCR (TaqMan® Low Density Arrays (TLDA) 7900 HT Micro Fluidic Cards) in an independent multi-institutional cohort (53 mCRC patients). Seven of these genes were confirmed as significant predictors of response. Patients with a favorable predictive signature had significantly greater response rate (58% vs 13%,  $p = 0.024$ ), progression-free survival (61% vs 13% at 1 year, HR = 0.32,  $p = 0.009$ ) and overall survival (32 vs 16 months, HR = 0.21,  $p = 0.003$ ) than patients with an unfavorable gene signature. This is the first study to validate a gene-expression profile predictive of response to CT in mCRC patients. Larger and prospective confirmatory studies are required, however, in order to successfully provide oncologists with adequate tools to optimize treatment selection in routine clinical practice.**

### INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common tumor in the world and is responsible for 8% of cancer related deaths [1]. Although prognosis has greatly improved over the past decades due to significant surgical and medical advances, once the tumor has progressed beyond surgical resectability the disease is essentially

incurable. Several combination regimens including fluoropyrimidines and oxaliplatin and/or irinotecan, with or without monoclonal antibodies targeting VEGF or EGFR, remain the mainstay of care in metastatic CRC (mCRC). Response rates, however, are observed in only 40–60% of the patients and median survival does not generally exceed 24 months [2, 3, 4]. As treatment options expand, the development of reliable tools to discriminate



patients likely to benefit from specific therapies remains a major clinical challenge. Indeed, with the exception of RAS mutations as predictors of resistance to EGFR-targeted therapy, no validated biomarker to date has been able to assist clinicians in the selection of the most appropriate treatment regimen for a specific patient [5, 6].

Gene expression profiling has demonstrated great potential in cancer research, improving diagnostic, prognostic and predictive precision in several tumor types [7], including CRC [8]. Over the last two decades, different studies have proved that gene expression profiles are able to discriminate normal colonic tissue from benign adenomas and adenocarcinomas in different stages of tumor progression [9], or to stratify the risk of developing CRC of normal colonic tissue [10]. More recently, different gene signatures developed in early-stage CRC have shown to predict the risk of relapse in these patients [11–14], and some of them have demonstrated improved prognosis accuracy over conventional clinical and pathological features [15]. By contrast, however, the value of this technology to predict response to therapy has not been deeply investigated. Although a number of studies have successfully identified gene signatures able to predict sensitivity to different agents in CRC cell lines [16, 17], studies assessing the potential predictive role of gene profiling in patients with advanced disease are scarce [18–20]. Therefore, larger and validation studies are needed to generate reliable data capable to make the desirable transition to the clinic.

Our aim in this project was to generate a gene profile predictor of response to chemotherapy in patients with mCRC treated with fluoropyrimidine-based regimens. Whole genome expression analyses were performed in tumor samples of mCRC patients and differentially expressed genes were then validated by RT-qPCR in an independent cohort of mCRC patients.

## RESULTS

### Gene expression profile development (training cohort)

Whole human genome expression profiles were assessed in tumor samples of patients in the training cohort ( $N = 37$ ) using Affymetrix U133 Plus 2.0 chips. All of the samples provided adequate RNA for microarray analysis. Supervised analysis identified 595 differentially expressed genes ( $p < 0.05$ ) in responders (23 patients; 62%) versus non-responders (14 patients; 38%) (Figure 1A). In addition, when supervised analyses were performed with PFS as a surrogate marker for response (Figure 1B), 318 genes were identified to be differentially expressed in patients with long ( $>$  median PFS) versus short ( $\leq$  median PFS) PFS values. Among the top 250 genes with greater statistical significance (lower  $P$  values) in cluster analyses using objective response to chemotherapy

as the primary outcome measure, a set of 161 genes were selected for further validation by RT-qPCR based on the greater magnitude of their fold-change values, the degree of concordance for both outcome measures (objective response and PFS), and their biological relevance in CRC. A detailed list of the 161 selected genes is depicted in supplementary Table S3.

### Validation of the gene signature predictive of response to chemotherapy in mCRC patients

Selected genes were assessed by Taqman-based RT-qPCR in tumor samples of the validation multi-institutional cohort of mCRC patients. As depicted in Table 1, 7 of these genes were validated to be differentially expressed among patients that achieved an objective response to chemotherapy (R: CR + PR) versus those that did not (NR: SD + PD) using the Statminer<sup>®</sup> software v.4.2 (adjusted  $p$  values  $< 0.05$ ): *DCK*, *DNAJC3*, *NAV1*, *NIPBL*, *PALM2*, *VSNL1* and *WSHC1L1*.

### Risk score according to the 7-gene signature

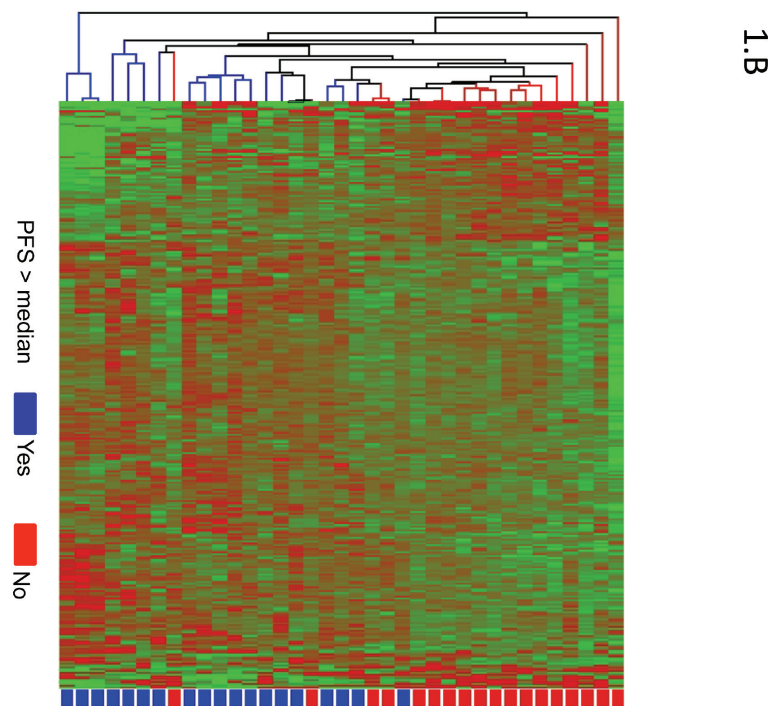
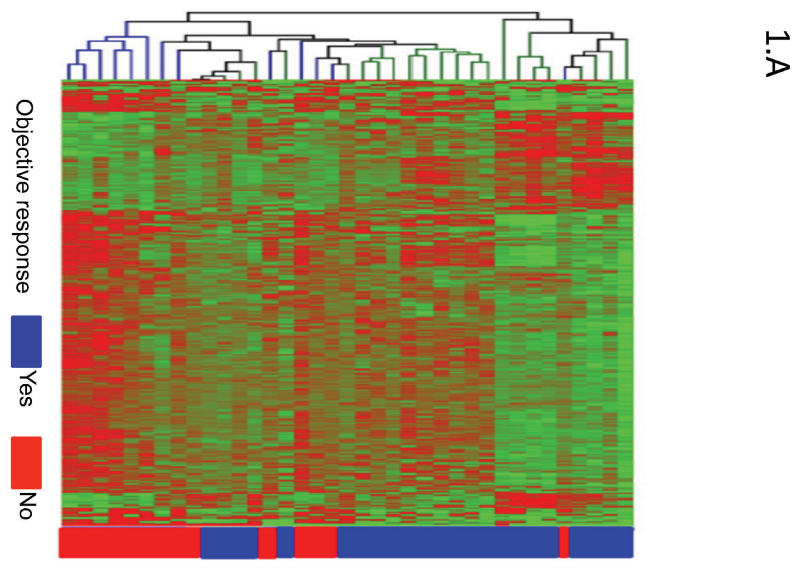
Following independent validation of the 7 genes, a risk score was developed to classify each patient as high score or favorable predictive signature, if they had favorable gene expression levels in at least 4 of the 7 genes in the signature, or low score or unfavorable predictive signature, if they had favorable gene expression levels in  $\leq 3$  of the 7 genes in the signature. Patients with a favorable predictive signature had a significantly greater response rate (58% vs 13%,  $p = 0.024$ ) and PFS (61% vs 13% at 1 year, HR = 0.32,  $p = 0.009$ ) than patients with an unfavorable predictive signature. Overall survival was also significantly longer for patients with high versus low score signatures (32 vs 16 months, HR = 0.21,  $p = 0.003$ ). Figure 2 illustrates PFS and OS of patients according to the 7-gene score.

### Biological and molecular function of validated predictive genes

According to the GeneOntology [21] classification, these genes are involved in the following biological functions or molecular pathways: control of cell shape or adhesion (*PALM2*), transcription regulation (*WSHC1L1*), stem cell maintenance (*NIPBL*), chaperone binding (*DNAJC3*), nucleotide and folic acid metabolism (*DCK*), microtubule bundle formation (*NAV1*), and ion transport and binding (*VSNL1*). Detailed description of genes and the functional classes to which they belong is outlined in Table 2.

## DISCUSSION

In this study we developed a gene expression profile able to predict treatment response in mCRC patients treated with fluoropyrimidine-based standard chemotherapy regimens. Seven genes were independently validated to



**Figure 1: (A) Supervised hierarchical cluster analysis showing differentially expressed genes in patients achieving an objective response to chemotherapy (Yes: CR or PR; blue) versus patients non-responding to chemotherapy (No: SD or PD; red). Genes in red indicate overexpression; those in green indicate underexpression. (B) Supervised hierarchical cluster analysis showing differentially expressed genes in patients achieving a progression free survival (PFS) higher than the median of PFS (Yes; blue) versus patients with a PFS lower than the median (No; red). Genes in red indicate overexpression; those in green indicate underexpression.**

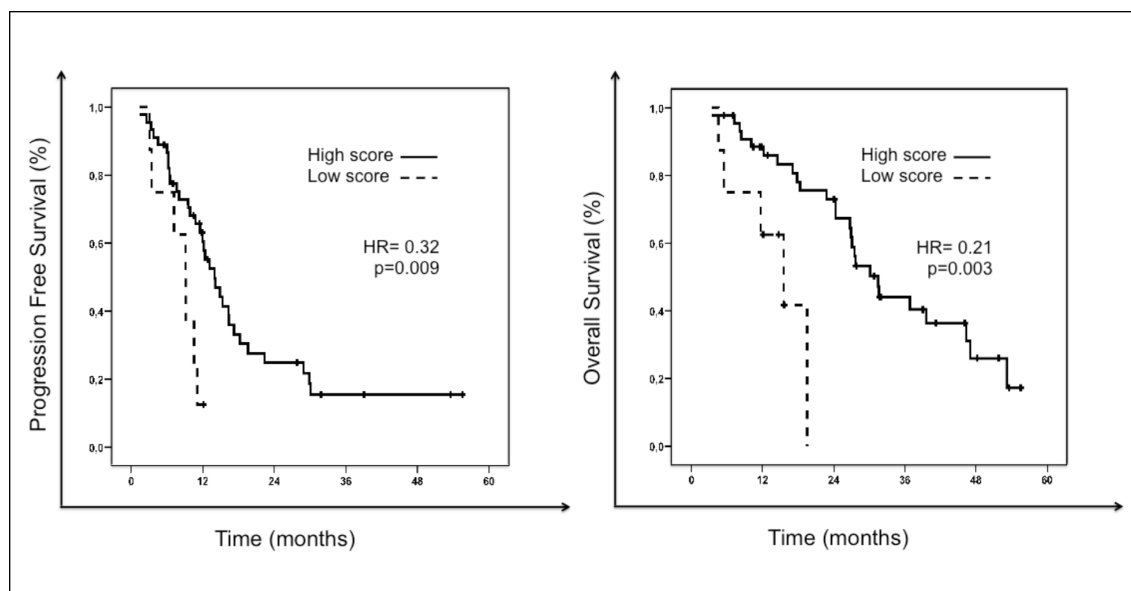
**Table 1: Differentially expressed genes by chemotherapy response in patients with metastatic colorectal carcinoma according to real-time PCR analysis**

Gene	Gen ID	R vs NR(- $\Delta\Delta C_t$ )	Adjusted <i>P</i> -values*	Fold-change
<i>DCK</i>	1633	1.300	<b>0.035</b>	<b>2.46</b>
<i>DNAJC3</i>	5611	1.621	<b>0.008</b>	<b>3.08</b>
<i>NAV1</i>	89796	1.231	<b>0.035</b>	<b>2.35</b>
<i>NIPBL</i>	25836	1.310	<b>0.035</b>	<b>2.48</b>
<i>PALM2</i>	445815	1.237	<b>0.040</b>	<b>2.36</b>
<i>VSNL1</i>	7447	1.552	<b>0.009</b>	<b>2.93</b>
<i>WHSC1L1</i>	54904	1.249	<b>0.358</b>	<b>2.38</b>

Patients treated with chemotherapy were stratified into one of two groups: 1) chemotherapy responders (R), including patients with complete response or partial response or 2) chemotherapy non-responders (NR), including patients with stable disease or progressive disease, according to RECIST 1.1 criteria.

\*The resulting *p*-values were adjusted for multiple testing by Benjamini-Hochberg adjustment.

Gene ID: Genbank accession number.



**Figure 2: Progression free survival (PFS) and overall survival (OS) of patients according to the 7-gene score predictive of response to chemotherapy.** The solid black line represents patients with high score or favorable predictive signature: those with favorable gene expression levels (above the median) in  $\geq 4$  genes of the signature. The dashed black-line represents patients with low score or unfavorable predictive signature: those with favorable gene expression levels in  $\leq 3$  genes of the signature.

be significantly overexpressed in patients achieving an objective response to chemotherapy. A risk score was developed with these 7 genes that was able to prospectively discriminate those patients most likely to benefit from therapy. Indeed, patients with a favorable predictive signature (favorable gene expression levels in at least 4 of the 7 genes in the signature) had a significantly greater response rate (58% vs 13%,  $p = 0.024$ ), PFS (61% vs 13% at 1 year, HR = 0.32,  $p = 0.009$ ) and OS (32 vs 16 months,

HR = 0.21,  $p = 0.003$ ) than patients with an unfavorable predictive signature. This is to our knowledge the first study to validate a gene-expression profile predictive of response to chemotherapy in advanced colorectal patients.

Many attempts have been made over the past decades to identify molecular markers predictive of response to chemotherapy in the context of CRC. Altered gene or protein expression of a number of genes have been associated with drug cytotoxicity, including thymidylate

**Table 2: Gene profile that predicts response to chemotherapy in mCRC patients**

Probe Set Identification	Gene Symbol	Official Name	Gene ID	GO Biological Processes (BP) and Molecular Function (MF) Description
203302_at	<i>DCK</i>	deoxycytidine kinase	1633	BP: Nucleotide metabolism MF: Deoxycytidine kinase activity, ATP binding
208499_s_at	<i>DNAJC3</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	5611	BP: Defense response to virus, catabolic process MF: chaperone binding, misfolded protein binding, protein kinase inhibitor
224771_at	<i>NAVI</i>	neuron navigator 1	89796	BP: neuron migration, microtubule bundle formation MF: nucleotide binding
242352_at	<i>NIPBL</i>	Nipped-B homolog	25836	BP: embryonal development, stem cell maintenance, response to DNA damage stimulus, negative regulation of transcription DNA dependent, positive regulation of histone deacetylation MF: chromatin binding, histone deacetylase binding, mediator complex binding, protein binding (C-terminus and N-terminus)
202760_s_at	<i>PALM2</i>	PALM2-AKAP2 readthrough	445815	BP: regulation of cell shape
203798_s_at	<i>VSNL1</i>	visinin-like 1	7447	MF: calcium ion binding
222544_s_at	<i>WHSC1L1</i>	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	54904	BP: cell differentiation and growth, histone lysine methylation, regulation of transcription DNA dependent MF: histone-lysine N-methyltransferase activity, zinc ion binding

synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase or thymidine phosphorylase for 5FU, topoisomerase I for irinotecan, or excision repair cross-complementing 1 (ERCC1) for oxaliplatin. However, none of these putative markers have been implemented in clinical practice due to their poor prediction accuracy and also to the lack of reproducibility across different studies and patient populations. These discrepancies are not unexpected, as sensitivity to treatment is a complex issue dependent on many individual and tumor factors, that ultimately determine, among other critical issues, drug disposition and pharmacodynamic effects on normal and malignant cells, as well as cell response to drug damage. The common use of multiple-drug regimens further complicates this scenario. In this context, multiple-gene signatures are likely to improve prediction accuracy over single marker genes [8, 15, 16]. However, and in spite of the undeniable success of several microarray-based prognostic gene signatures, currently being validated in prospective clinical trials [22–26] (i.e. Mammaprint and Oncotype DX in breast cancer, or Coloprint in CRC), predictive genomics remain a challenge.

Our study validated several predictive genes implicated in key cellular pathways and also some genes with molecular functions potentially related to chemotherapy response. Deoxycytidine kinase (DCK) is required for the phosphorylation of several deoxyribonucleosides and their

nucleoside analogs, which are widely used as antiviral and anticancer agents (i.e. cytarabine, gemcitabine). Increased DCK activity is associated with increased activation of these compounds to cytotoxic nucleoside triphosphate derivatives, and DCK deficiency correlated with resistance to these agents in a panel of hematologic and solid cell lines *in vitro*, and also in some human tumors [27]. VSNL1 is a member of the visinin/recoverin subfamily of neuronal calcium sensor proteins, mainly expressed in the central nervous system, that modulate intracellular signaling pathways by regulating the activity of adenylyl cyclase. Upregulation of VSNL1 potentiated the anoikis-resistant ability of neuroblastoma tumor cells and enhanced neuroblastoma cell invasiveness and metastasis [28]. Some authors have also suggested VSNL1 may play an important role in the invasive phenotype of CRC, and may also influence sensitivity to cytotoxic agents active in this disease, such as camptothecins [29]. Indeed, VSNL1 overexpression was associated with a higher risk of lymphatic invasion and a poorer prognosis in a series of patients with early stage CRC [30], and downregulation of this gene was observed in camptothecin-resistant gastric cancer cell lines [29]. Finally, PALM2 has been reported to be upregulated in responder CRC tumors to MS-275, a selective histone deacetylase inhibitor that disturbs cell adhesion, response to extracellular stimuli and transcription cellular processes



[31]. However, the function of the putative protein product of PALM2-AKAP2, a naturally occurring cotranscribed mRNA, remains to be elucidated.

While gene expression profiling has been widely applied to CRC for diagnosis, classification and prognosis, studies evaluating its potential role to predict response to medical therapy are still scarce. Indeed, most available data to date derive from preclinical studies. Mariadason and colleagues demonstrated the ability of gene profiling to predict 5FU- and irinotecan-induced apoptosis in a panel of 30 CRC cell lines [16], and, importantly, they showed how this approach predicted response more accurately than 4 previously established determinants of 5FU response: thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, mismatch repair status and p53 mutation [16]. Other investigators have also reported gene signatures predictive of 5FU or oxaliplatin sensitivity *in vitro* [17]. However, very few studies have assessed the predictive role of gene profiling in the clinical setting (i.e. patients with advanced CRC) [18, 19]. Del Rio *et al* identified 14 genes predictive of response to FOLFIRI (5-FU, leucovorin and irinotecan) in a series of 21 patients with mCRC [18], whereas Watanabe *et al* reported a 27-gene prediction model of response to FOLFOX (5-FU, leucovorin and oxaliplatin) in 40 mCRC patients [19]. Of note, none of these small studies attempted to validate the observed results by alternative techniques or in independent patient cohorts. In our study, by contrast, genes identified by whole genome expression analyses to predict response to chemotherapy were further assessed by RT-qPCR in an independent multi-institutional validation cohort. Although direct comparison of genes from predictive signatures reported by Del Rio, Watanabe and our group shows no overlap, common signaling networks were identified to play a relevant role in this context according to the Gene Ontology classification, including cell growth and proliferation, angiogenesis, cell adhesion, immune response and ion/protein transport and binding. A number of reasons may partially explain the lack of consistent results across studies, including heterogeneity in patient characteristics and treatment regimens, study design (prospective versus retrospective), source of predictive tissue, tissue collection procedures, platform used, and statistical and analytical methods. The lack of a control population and of independent validation in a larger cohort of patients is also a major pending issue before this promising tool may be used by oncologists to tailor patient treatment. Our group is currently undergoing a prospective study to validate these findings in paraffin-embedded tissue.

In conclusion, our study identified a 7-gene profile predictive of response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in mCRC. This is to our knowledge the first validated predictive profile in advanced colorectal cancer patients. Functional classification of these genes revealed their implication in key pathways of CRC biology, as well as in molecular processes potentially linked to drug

sensitivity. As treatment options in CRC continue to expand, the development of predictive signatures shall become invaluable tools to assist clinicians to appropriately select the most effective therapy in each patient and also in providing new clues regarding key molecular pathways involved in drug response. Larger and prospective confirmatory studies are required, however, in order to successfully implement predictive gene-signatures in clinical practice.

## METHODS

### Patients and tumor samples

From 2008 to 2010, patients that met the following inclusion criteria were selected for the present study: 1) histologically confirmed diagnosis of primary CRC; 2) TNM stage IV [32]; 3) treatment with at least one fluoropyrimidine-based chemotherapy regimen for advanced disease; 4) evaluable for response according to RECIST criteria [33]; 5) adequate tissue specimen available for molecular assays (snap-frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  with a proportion of tumor cells  $> 50\%$ ). Follow-up was performed in all centers as per ESMO guidelines [34], including a CT scan for response assessment every 8 to 12 weeks in the absence of clinical deterioration or any other clinical suspicion of disease progression. The study protocol was approved by the institutional review boards of participating centers and written consent was provided by all included patients.

Whole genome expression analysis was performed in a training cohort of CRC samples ( $N = 37$ ) collected at the Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain. The gene profile was validated by RT-qPCR in an independent multi-institutional cohort that included 53 tumor samples collected at three Spanish hospitals (Hospital Virgen del Rocío (Seville), Hospital Virgen de la Victoria (Malaga) and Hospital de la Merced (Osuna)). Main characteristics of the study population are summarized in supplementary Tables S1 and S2, and are representative of a standard metastatic CRC population. Distribution of clinical and pathological features in the training and validation cohorts did not differ significantly.

### RNA isolation and processing

All tissue samples were preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction and processing. Sample homogenization was achieved using QIAshredder homogenizers and total RNA was extracted using RNeasy Mini kit (both kits from Qiagen Inc; Valencia, CA, USA).

### Microarray gene expression assays

Microarray gene expression assays were performed for each of the 37 samples using Human Whole Genome U133 Plus 2.0 array (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA) based on manufacturer's instructions. Following

hybridization, arrays were scanned using a GC3000 laser confocal scanner (Affymetrix), and microarray image data were analyzed by GeneChip Operating Software (GCOS 1.4 Affymetrix). Microarray raw data tables have been deposited at the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (accession number GSE52735).

### Validation of differentially expressed genes by RT-qPCR

Custom-designed TaqMan® Low Density Arrays (TLDA) 7900 HT Micro Fluidic Cards including the 161 genes selected for validation were run and analyzed by the ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (SDS 2.2, Applied Biosystems) according to manufacturer's protocol.

### Statistical analysis

#### Clinical variables

Descriptive statistics were used to characterize the most relevant clinical parameters. The association of categorical variables was explored by the chi-squared test or Fisher's exact test. To assess distribution of continuous variables among study groups, parametric (*t*-test) or non-parametric tests (Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests) were used when appropriate. Tumor response was evaluated according to the standard RECIST 1.0 criteria [33] to categorize patients as responders ([R]: complete response [CR] + partial response [PR]) or non-responders ([NR]: stable disease [SD] + progression disease [PD]). Progression Free Survival (PFS) was defined as the time elapsed from the date of initiation of first-line chemotherapy to the date of the first documented evidence of disease progression. Overall survival (OS) was calculated from the start of therapy for advanced disease to the date of death from any cause. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method, and survival differences among groups were assessed by the log-rank test.  $p < 0.05$  was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 18.0 for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL).

#### Microarrays

Partek Genomics Suite v7.3.1 (Partek Inc.; St. Louis, MO, USA) was used for statistical analysis. Array quality was assessed using the parameters *P call %*, *Array outlier* and *Normalized Unscaled Standard Error (NUSE)*. Subsequently, data were pre-processed by the RMA (Robust Multichip Average) method. A linear regression model using PCA (principal components analysis) and clustering techniques was done to identify differential gene expression profiles among the two study conditions (responders versus non-responders to first-line

chemotherapy for mCRC). As a surrogate marker of chemotherapy response, supervised analysis were also performed to assess differential expression among patients with long versus short progression-free survival (above versus below the median, respectively).

#### qRT-PCR analysis

Cycle threshold (Ct) values were calculated using the SDS software v.2.3 (Applied Biosystems) using automatic baseline settings and a threshold of 0.2. GAPDH was used as endogenous control. Data are presented as target gene expression =  $2^{-\Delta Ct}$ , with  $\Delta Ct = (\text{target gene Ct} - \text{GAPDH Ct})$ . Gene expression was computed by real-time Statminer® software v.4.2 (Intergromics, Inc), using the Benjamini-Hochberg algorithm [35] with the FDR set at  $\alpha$  value of 5%. Gene expression had to be detected in at least 50% of samples in each study group in order to be considered for analysis. PCR GEO accession number GSE52513.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant of the Fundacion Mutua Madrileña (FMM) (P0497/2006) and from the Fondo de Investigación Sanitaria/Instituto de Salud Carlos III Spanish Cancer Networks RTICC (R12/0036/0008 and R12/0036/0028). RGC is funded by Fondo de Investigación Sanitaria (PI10/02164, PI13/02295), Servicio Andaluz de Salud (PI-0259/2007) and RTICC (R12/0036/0028). PEG is funded by a Rio Hortega grant (09/00207) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCiii), Ministerio de Sanidad, Spain and Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (PI-0135–2010). SMP is funded by Fondo de Investigación Sanitaria (CD1100153) and Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer. MDP is funded by Fondo de Investigación Sanitaria (CD0900148). LPA is funded by the ISCiii (PI081156, PI1102688, RTICC R12/0036/0008), Consejería de Innovacion, Ciencia y Empresa – Junta de Andalucía (P08-CVI-04090) and the 75<sup>th</sup> Anniversary Roche Spain Fellowship. AC is funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2009–08605), FIS (PI12/00137), Consejería de Ciencia e Innovacion and Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (CTS-6844 and PI-0142), and by Fundacion Oncologica FERO, supported by Fundació Josep Botet.

The authors would like to thank the donors and the Andalusian Public Health System Biobank Network (ISCI-Red de Biobancos RD09/0076/00085) for the human tumor specimens provided for this study. We would also like to thank the biostatisticians and technical staff from Progenika for technical assistance.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010; 127:2893–2917.
2. Aranda E, Abad A, Carrato A, Cervantes A, García-Foncillas J, García Alfonso P, García Carbonero R, Gómez España A, Tabernero JM, Díaz-Rubio E. Treatment recommendations for metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2011; 13:162–178.
3. Cunningham D, Atkin W, Lenz H-J, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010; 375:1030–1047.
4. Casado-Saenz E, Feliu J, Gomez-España MA, Sanchez-Gastaldo A, Garcia-Carbonero R. SEOM Clinical guidelines for the treatment of advanced colorectal cancer 2013. *Clin Transl Oncol*. 2013; 15:996–1003.
5. Ross JS, Torres-Mora J, Wagle N, Jennings TA, Jones DM. Biomarker-based prediction of response to therapy for colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134:478–490.
6. García-Alfonso P, Salazar R, García-Foncillas J, Musulén E, García-Carbonero R, Payá A, Pérez-Segura P, Ramón y Cajal S, Navarro S; Spanish society of medical oncology (SEOM); Spanish society of pathology (SEAP). Guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma (CRC): a national consensus of the Spanish society of pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol*. 2012; 14:726–39.
7. van 't Veer LJ, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature*. 2008; 452:564–570.
8. Brettingham-Moore KH, Duong CP, Heriot AG, Thomas RJ, Phillips WA. Using gene expression profiling to predict response and prognosis in gastrointestinal cancers-the promise and the perils. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18:1484–1491.
9. Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A, Astolfi A, Formica S, Biasco G. Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives. *Cancer Treatment Reviews*. 2009; 35:201–209.
10. Augenlicht LH, Taylor J, Anderson L, Lipkin M. Patterns of gene expression that characterize the colonic mucosa in patients at genetic risk for colonic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991; 88:3286–3289.
11. Wang Y, Jatkoa T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL, Atkins D. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22:1564–1571.
12. Gray RG, Quirke P, Handley K, Lopatin M, Magill L, Baehner FL, Beaumont C, Clark-Langone KM, Yoshizawa CN, Lee M, Watson D, Shak S et al. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29:4611–4619.
13. Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P, Davison T, Black JM, Kay EW, Holt RJ, Proutski V, Ahdesmaki M, Farztdinov V, Goffard N, Hey P, et al. Development and Independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Oncol*. 2011; 29:4620–4626.
14. O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, Paik S, Clark-Langone KM, Lopatin M, Watson D, Baehner FL, Shak S, Baker J, Cowens JW, Wolmark N. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol*. 2010; 28:3937–3944.
15. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Westerga J, Bruin S, Kerr D et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29:17–24.
16. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, Aranes MJ, Lesser M, Schwartz EL, Augenlicht LH. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res*. 2003; 63:8791–8812.
17. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Arañes MJ, Nicholas C, Lesser M, Mariadason JM, Augenlicht LH. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2004; 91:1931–46.
18. Del Rio M, Molina F, Bascoul-Molleivi C, Copois V, Bibeau F, Chalbos P, Bareil C, Kramar A, Salvetat N, Fraslon C, Conseiller E, Granci V et al. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J Clin Oncol*. 2007; 25:773–80.
19. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Konishi T, Horie H, Ikeuchi H, Eshima K, Muto T. Gene expression signature and response to the use of leucovorin, fluorouracil and oxaliplatin in colorectal cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2011; 13:419–25.
20. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschlegel S, Ostos LC, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 2013; 19:619–25.
21. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*. 2000; 25:25–29.
22. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347:1999–2009.

23. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98:1183–92.
24. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351:2817–26.
25. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, Baker J, Walker M, Watson D, Hackett J, Blick NT, Greenberg D et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res.* 2006; 8:R25.
26. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24:3726–34.
27. van der Wilt CL, Kroep JR, Loves WJ, Rots MG, Van Groeningen CJ, Kaspers GJ, Peters GJ. Expression of deoxycytidine kinase in leukaemic cells compared with solid tumour cell lines, liver metastases and normal liver. *Eur J Cancer.* 2003; 39:691–697.
28. Xie Y, Chan H, Fan J, Chen Y, Young J, Li W, Miao X, Yuan Z, Wang H, Tam PK, Ren Y. Involvement of visinin-like protein-1 (VSNL-1) in regulating proliferative and invasive properties of neuroblastoma. *Carcinogenesis.* 2007; 28:2122–30.
29. Wu XM, Shao XQ, Meng XX, Zhang XN, Zhu L, Liu SX, Lin J, Xiao HS. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in hydroxycamptothecin resistant gastric cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2011; 32:259–69.
30. Akagi T, Hijiya N, Inomata M, Shiraishi N, Moriyama M, Kitano S. Visinin-like protein-1 overexpression is an indicator of lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2012; 131:1307–1317.
31. Bracker TU, Sommer A, Fichtner I, Faus H, Haendler B, Hess-Stumpp H. Efficacy of MS-275, a selective inhibitor of class I histone deacetylases, in human colon cancer models. *Int J Oncol.* 2009; 35:909–920.
32. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York: Springer. 2010.
33. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:205–216.
34. Schmoll HJ et al. ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012; 23:2479–516.
35. Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1995; 57:289–300.



## Anexo 2: Patentes

---

Inventores: Rocio Garcia Carbonero, Luis Paz-Ares, Sonia Molina Pinelo, Amancio Carnero Moya, **Purificación Estevez**.

Patente Española: **P201331405** (ref: P-06647-FISEVI-13008).

Título “Método para predecir la respuesta al tratamiento con quimioterapia en pacientes con cáncer colorectal”

Fecha de solicitud: 26 Septiembre 2013

Fecha de vencimiento de prioridad: 26 Septiembre 2014

Fecha de vencimiento fases nacionales: 26 Marzo 2016

Titularidad IBIS (HUVR/CSIC/Universidad Sevilla).