

TESIS DOCTORAL

**FACTORES PRONÓSTICOS Y HETEROGENEIDAD
TUMORAL EN CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO.
ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS MORFOLÓGICAS,
ARRAYS Y SECUENCIACIÓN MASIVA.**

Sofía del Carmen Martínez

Directores:

María del Mar Abad Hernández

José María Sayagués Manzano

Luis Muñoz Bellvis



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



HOSPITAL
UNIVERSITARIO
DE SALAMANCA



Dña. MARÍA DEL MAR ABAD HERNÁNDEZ, doctora en Medicina, adscrita al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca

CERTIFICA QUE:

El trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por D. Sofía del Carmen Martínez titulado “Factores pronósticos y heterogeneidad tumoral en cáncer colorrectal esporádico. Estudio mediante técnicas morfológicas, arrays y secuenciación masiva”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca a 10 de abril del año dos mil diecinueve.

Fdo. Dra. María del Mar Abad Hernández Ph.D



HOSPITAL
UNIVERSITARIO
DE SALAMANCA



D. JOSE MARIA SAYAGUES MANZANO, Investigador del Sistema Nacional de Salud, adscrito al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca

CERTIFICA QUE:

El trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por D. Sofía del Carmen Martínez titulado “Factores pronósticos y heterogeneidad tumoral en cáncer colorrectal esporádico. Estudio mediante técnicas morfológicas, arrays y secuenciación masiva”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca a 10 de abril del año dos mil diecinueve.

Fdo. Dr. José María Sayagués Ph.D



HOSPITAL
UNIVERSITARIO
DE SALAMANCA



D. LUIS MUÑOZ-BELLVIS, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de Cirugía y Jefe de Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Salamanca

CERTIFICA QUE:

El trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por D. Sofía del Carmen Martínez titulado “Factores pronósticos y heterogeneidad tumoral en cáncer colorrectal esporádico. Estudio mediante técnicas morfológicas, arrays y secuenciación masiva”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca a 10 de abril del año dos mil diecinueve.

Fdo. Dr. Luis Muñoz-Bellvis Ph.D

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
I. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	5
II. INTRODUCCIÓN	9
1. CÁNCER COLORRECTAL: ASPECTOS CLÍNICOS	9
1.1. ETIOLOGÍA DEL CCR.....	12
1.2. CLÍNICA DEL CCR.....	15
1.3. DIAGNÓSTICO	17
1.3.1. Cribado del CCR.....	17
1.3.2. Pruebas diagnósticas.....	18
1.4. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	22
1.4.1. Lesiones precursoras del CCR.....	22
1.4.2. Características histopatológicas del CCR ^{67,68}	24
1.5. ESTADIAJE TNM DEL CCR. CLASIFICACIÓN Y ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA DE LA ENFERMEDAD.	31
1.6. TRATAMIENTO DEL CCR.....	34
1.6.1. Tratamiento quirúrgico	34
1.6.2. Tratamiento quimioterápico	36
1.6.3. Tratamiento radioterápico. Radioterapia postoperatoria y quimiorradioterapia neoadyuvante	36
1.6.4. Terapias dirigidas	37

1.6.5.	Inmunoterapia.....	38
1.7.	FACTORES PRONÓSTICOS	41
2.	GENÉTICA DEL CCR	43
2.1.	SUBTIPOS GENÉTICOS DE CCR	43
2.1.1.	CCR hereditario.....	43
2.1.2.	CCR esporádico.....	45
2.2.	PATOGÉNESIS DEL CCR	46
2.2.1.	La secuencia adenoma-carcinoma	46
2.2.2.	La vía de los adenomas serrados.....	47
2.3.	MODELOS GENÉTICOS DE PROGRESIÓN TUMORAL.....	48
2.3.1.	Inestabilidad cromosómica (CIN).....	49
2.3.2.	Inestabilidad de microsatélites (MSI).....	52
2.3.3.	Fenotipo metilador de islas CpG (CIMP).....	54
2.3.4.	Vía inflamatoria	55
2.4.	VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN EL CCR	56
2.4.1.	Vía de señalización WNT/ β -catenina.....	56
2.4.2.	Vía de señalización de PIK3/AKT.....	57
2.4.3.	Vía de señalización de MAPK/ERK.....	58
2.4.4.	Vía de señalización de TP53.....	60
2.4.5.	Vía de señalización de TGF- β	60
2.4.6.	Vía de señalización de Notch.....	61
2.4.7.	Vía de señalización Hedgehog.....	62
2.4.8.	Vía de señalización de NF- κ B/IKK.....	63
2.5.	IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS DEL CCR.....	66
2.5.1.	Implicaciones de las vías de progresión para la detección y prevención del CCR.....	66
2.5.2.	Marcadores pronósticos genéticos.....	66
2.5.3.	Implicaciones clínicas de la heterogeneidad genética a del CCR a nivel intra-tumoral	70
2.6.	FACTORES MOLECULARES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	73
2.6.1.	Respuesta a fluorouracilo.....	73
2.6.2.	Respuesta a irinotecán	74
2.6.3.	Otras alteraciones predictivas de respuesta a la quimioterapia	74
2.6.4.	Factores predictivos de respuesta a inhibidores de EGFR.....	74
2.7.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÓMICO	79
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	83
IV.	MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS	87

1.	Artículo 1: “Evaluación combinada del estadio TNM y el estado mutacional del gen <i>BRAF</i> en pacientes con cáncer colorrectal esporádico en el momento del diagnóstico”	89
2.	Artículo 2: “Heterogeneidad del estado mutacional de <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>PIK3CA</i> y <i>BRAF</i> en muestras pareadas de tumores primarios, ganglios linfáticos y metástasis hepáticas obtenidas de pacientes con cáncer colorrectal metastásico”	127
3.	Artículo 3: “Implicaciones pronósticas de la expresión proteica de EGFR en CCR y su correlación con el número de copias del gen, niveles de ARNm y regulación de la expresión por miARN”	141
V.	DISCUSIÓN	159
	SECUENCIACIÓN MASIVA PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN CCR ESPORÁDICO, CORRELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLINICO-BIOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD E IMPACTO PRONÓSTICO	161
	PATRONES DE EVOLUCIÓN CLONAL PRESENTES A NIVEL INTRATUMORAL EN EL CCR. PERFIL MUTACIONAL EN MUESTRAS PAREADAS DE TUMOR PRIMARIO, METÁSTASIS GANGLIONARES Y HEPÁTICAS EN PACIENTES CON CCR.	165
	PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO ASOCIADO AL PRONÓSTICO DEL CARCINOMA COLORRECTAL	170
VI.	CONCLUSIONES	177
VII.	BIBLIOGRAFÍA	179

I. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

ACF: focos de criptas aberrantes (del inglés aberrant crypt foci)

ADNtc: ADN tumoral circulante

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

AJCC: American Joint Committee on Cancer

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

AMP: Association for Molecular Pathology

ARNm: ARN mensajero

miARN: micro ARN

ASCO: American Association of Clinical Oncology

ASCP: American Association for Clinical Pathology

C

CAP: College of American Pathologists

CC: citogenética convencional

CCR: cáncer colorrectal

CCHNP: cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis

CEA: antígeno carcinoembrionario (del inglés carcinoembryonic antigen)

CGH: hibridación genómica comparada (del inglés comparative genomic hybridization)

CIN: inestabilidad cromosómica (del inglés chromosomal instability)

CIMP: fenotipo metilador de islas CpG (del inglés CpG island methylator phenotype)

CIMP-H: CIMP de alta frecuencia (del inglés CIMP-high)

CIMP-L: CIMP de baja frecuencia (del inglés CIMP-low)

COX: ciclooxigenasa

CTCs: células tumorales circulantes

D

DCC: gen deletado en cáncer de colon (del inglés de deleted in colorectal cancer)

E

EGF: factor de crecimiento epidérmico (del inglés epidermal growth factor)

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

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

EMT: transición epitelio-mesénquima

ESMO: European Society for Medical Oncology

F

FAP: poliposis adenomatosa familiar (del inglés familial adenomatous polyposis)

FISH: hibridación *in situ* fluorescente

*i*FISH: hibridación *in situ* fluorescente sobre núcleos interfásicos

5-FU: 5-fluorouracilo

I

IGF: factor de crecimiento de tipo insulina

IHQ: inmunohistoquímica

L

LOH: pérdida de heterocigosidad (del inglés loss of heterozygosity)

M

M: metástasis (del sistema de estadificación tumoral TNM)

MMR: sistema de reparación del ADN (del inglés mismatch repair)

MSI: inestabilidad de microsatélites (del inglés microsatellite instability)

MSI-H: altos niveles de inestabilidad de microsatélites (del inglés MSI-high)

MSI-L: bajos niveles de inestabilidad de microsatélites (del inglés MSI-low)

MSS: estabilidad de microsatélites (del inglés microsatellite stability)

N

N: afectación de ganglios linfáticos (del sistema de estadificación tumoral TNM)

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

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

R

RM: resonancia magnética

S

SG: supervivencia global

SLE: supervivencia libre de enfermedad

SNP: polimorfismo de nucleótido único (del inglés single nucleotide polymorphism)

SNS: Sistema Nacional de Salud

SP: sangre periférica

SOH: sangre oculta en heces

T

T: tumor (del sistema de estadificación tumoral TNM)

TNM: sistema de estadificación tumoral (del inglés Tumor – Node – Metastasis)

TC: tomografía computarizada

V

VEFG: factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés vascular endothelial growth factor)

W

WT: no mutado (del inglés wild type)

II. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL: ASPECTOS CLÍNICOS

El cáncer colorrectal (CCR) es un tumor epitelial maligno e invasivo que se origina a partir de las células glandulares de la mucosa colónica o rectal del tracto gastrointestinal. Este tumor constituye, el tercero en incidencia a nivel mundial para ambos sexos, detrás del cáncer de pulmón y próstata en varones, y del cáncer de mama y pulmón en mujeres¹, siendo su incidencia de 39,7 casos por cada 100.000 habitantes y año². El CCR representa la segunda causa de muerte por cáncer en ambos sexos (Figura 1 y Figura 2)^{1,3}. Estos datos reflejan la importancia creciente que tiene esta neoplasia.

Figura 1. Incidencia y mortalidad del CCR estimada en el año 2018. A: incidencia de CCR en ambos sexos. B: mortalidad de CCR (Globocan20181).

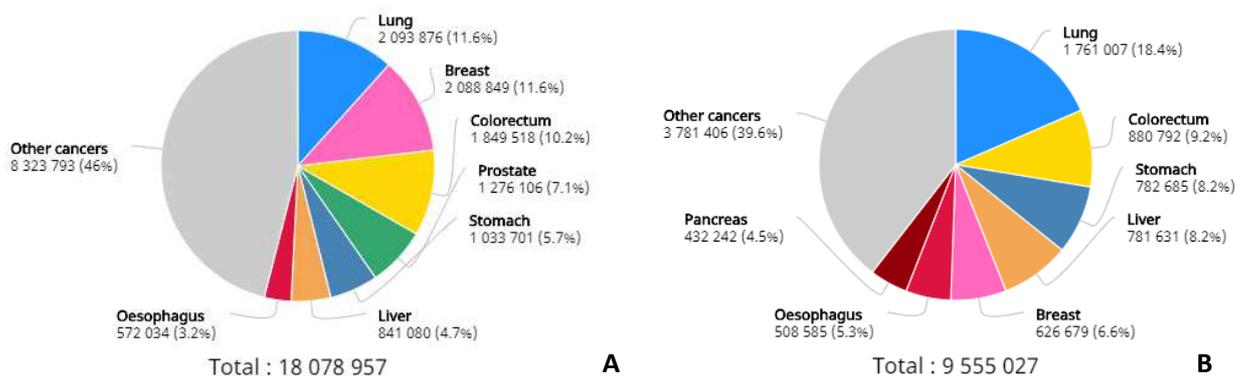
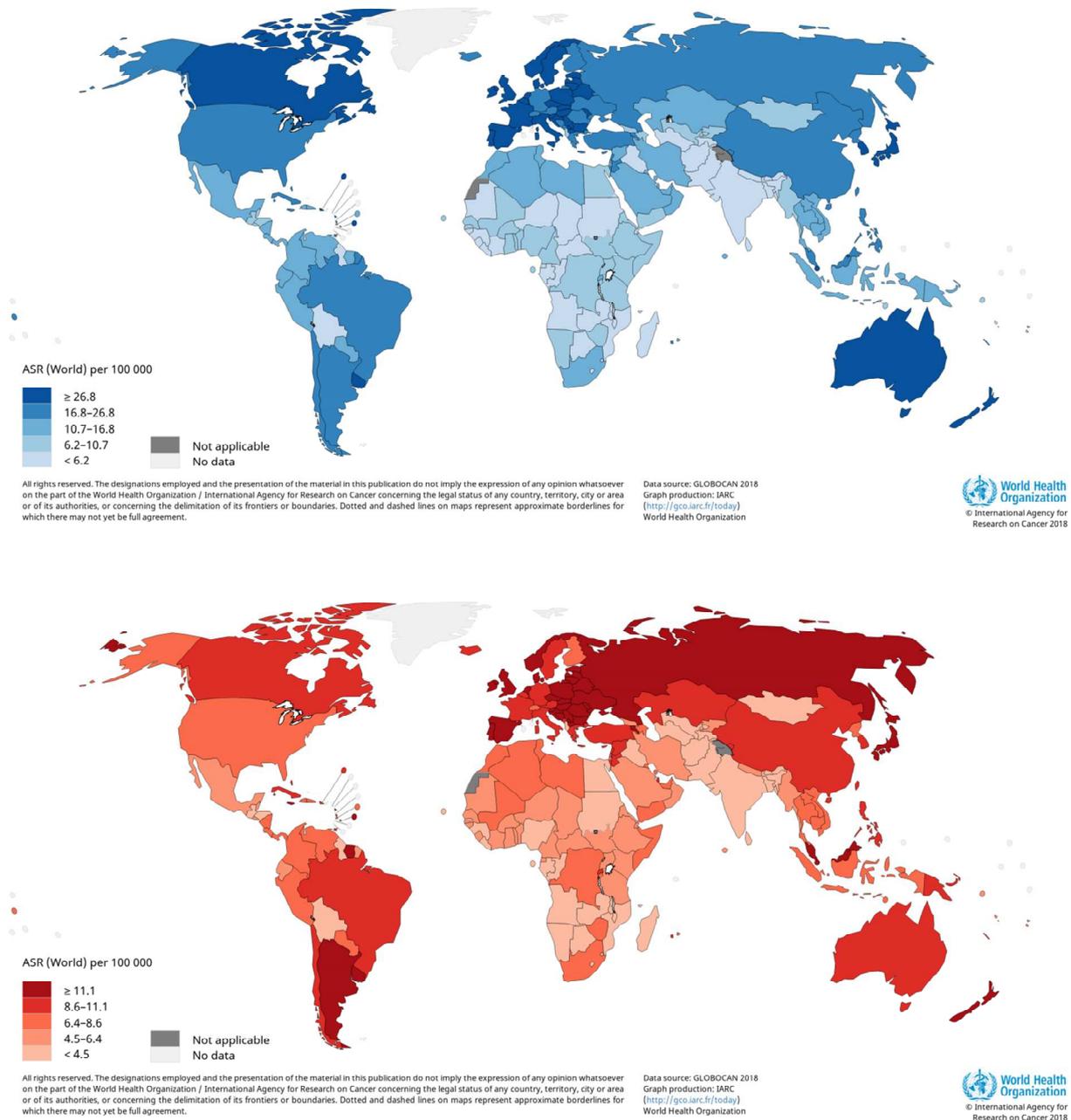


Figura 2. Incidencia y mortalidad del CCR estimada en el año 2018. A: incidencia de CCR en ambos sexos. B: mortalidad de CCR (Globocan20181).



Además, la incidencia del CCR aumenta con la edad, siendo rara su presentación antes de los 40 años, salvo en pacientes con determinados factores de riesgo. Más de la mitad de los pacientes (60%) la enfermedad se diagnostica a partir de los 55 años con una media de edad de 65 años (rango: 55-74 años)⁴. La mayoría de tumores colorrectales se localizan en el colon proximal (41%), seguidos por el recto (28%), aunque la proporción

de tumores proximales es mayor en mujeres y también aumenta con la edad⁴. Según la Sociedad Americana de Oncología Clínica, en el año 2017, se diagnosticaron 140,250 casos en los Estados Unidos, 97,220 casos nuevos de cáncer de colon (49,690 hombres y 47,530 mujeres) y 43,030 casos nuevos de cáncer del recto⁵. En relación al tipo histológico, más del 90% de los casos se corresponde con adenocarcinomas⁶.

La principal complicación del CCR es la aparición de metástasis a distancia, que desencadena la progresión con frecuencia incontrolable de la enfermedad. De hecho, alrededor del 25-30% de los pacientes se presentan de inicio como tumores metastásicos sincrónicos (estadio IV) y el resto, principalmente los diagnosticados en estadios II o III, entre el 20-50% van a progresar a estadios más avanzados y desarrollarán metástasis generalmente en los dos primeros años tras diagnóstico de la enfermedad (metástasis metacrónicas), por lo que el seguimiento de estos pacientes resulta ser un punto crucial en el abordaje terapéutico^{7,8}. El hígado es el órgano más frecuentemente colonizado por las células tumorales (50% de los casos)^{7,8}, seguido del pulmón (alrededor del 10%)^{9,10}. En términos generales, la supervivencia global (SG) a 5 años es de aproximadamente el 50%, llegando a ser del 10% en los pacientes con enfermedad en estadio IV¹¹.

1.1.ETIOLOGÍA DEL CCR

La etiología del CCR es multifactorial, y se sabe que los factores de riesgo para el desarrollo de CCR esporádico pueden ser tanto constitucionales como ambientales. Factores genéticos y médicos que aumentan el riesgo incluyen la historia familiar o el antecedente personal de CCR y/o pólipos, la presencia de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y factores hereditarios (por ejemplo el síndrome de Lynch o CCR no asociado a poliposis y la poliposis adenomatosa familiar). Algunos estudios han determinado que los individuos con diabetes tipo 2 tienen mayor riesgo de CCR. La edad es el factor de riesgo más relevante, ya que se presenta en individuos de mediana edad y edades avanzadas, aumentando la incidencia con la edad, diagnosticándose el 91% de casos en pacientes mayores de 50 años¹².

También son factores de riesgo, importantes y modificables, la dieta hipercalórica, pobre en fibra y rica en grasas animales, carnes rojas y procesadas, el tabaquismo y el alcohol, el estilo de vida sedentario, y la obesidad. El hecho de que los hábitos alimenticios y el estilo de vida influyan en la etiología del CCR, plantean la posibilidad de proponer estrategias a nivel de la salud pública para la modificación de hábitos, con el fin de disminuir la incidencia de esta enfermedad. En este sentido, la alimentación ha sido uno de los factores más estudiados¹³ y recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado la carne roja como probable carcinógeno (carcinógeno de grupo 2A) y la carne procesada como carcinógeno (carcinógeno grupo 1)¹⁴. Se han planteado como posibles mecanismos en la génesis tumoral la producción de aminas heterocíclicas durante el cocinado de la carne, la estimulación de niveles altos de ácidos biliares, la producción de especies reactivas de oxígeno y la elevación de niveles de insulina.

El consumo de tabaco y alcohol también se han visto asociado al CCR^{15,16,17}, aunque el riesgo relativo del consumo de tabaco es menor que para otros tumores¹⁸. También se ha visto un mayor riesgo de CCR asociado al estilo de vida sedentario¹⁹, además se han realizado numerosos estudios para tratar de establecer la relación de la obesidad con el CCR. De este modo, se ha visto que la insulina y los factores de crecimiento tipo insulina promueven la progresión y el crecimiento de los adenomas. La obesidad y la inactividad física producen resistencia a la insulina e hiperinsulinemia,

incluso dietas ricas en carbohidratos refinados hacen que la glucosa se absorba de manera rápida produciendo hiperinsulinemias postprandiales²⁰.

Por otra parte, las EII crónicas, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, son factores etiológicos importantes en el desarrollo de CCR. La colitis ulcerosa es un trastorno crónico de etiología desconocida que afecta a niños y adultos, con un pico de incidencia en la tercera década temprana. Se puede considerar un trastorno premaligno ya que numerosos estudios han confirmado el CCR como una complicación de la colitis ulcerosa. Las tasas de prevalencia oscilan entre el 3 y el 5% de todos los pacientes con la enfermedad. El riesgo aumenta con la duración de la enfermedad y es más alto en pacientes con manifestación temprana, ya que se ha visto que la tasa de cáncer es de un 20% por década después de los primeros diez años de colitis ulcerosa. El riesgo también es mayor en las personas con colitis ulcerosa extensa, es decir, aquellas en las que la enfermedad se extiende de manera proximal al colon transversal, con un riesgo de desarrollar CCR aproximadamente del 15% cuando hay afectación de más de la mitad del colon, frente a un riesgo aproximado del 5% en afectaciones sólo del lado izquierdo²¹. Sin embargo, la proctitis ulcerosa no se ha visto asociada con un mayor riesgo de carcinoma. De este modo, el riesgo es mayor en las personas con pancolitis de diez o más años de duración, superando en 20 a 30 veces el riesgo respecto a la población de control. En cuanto a la actividad de la enfermedad los datos sugieren que las personas con actividad intermitente tienen riesgos de cáncer similares a los de las personas con enfermedad crónica continua²². Los pacientes con enfermedad de Crohn pueden desarrollar carcinomas tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso. Al igual que en la colitis ulcerosa, la larga evolución y la aparición temprana de la enfermedad son factores de riesgo para el desarrollo de carcinomas²³.

Otro factor etiológico del CCR infrecuente pero conocido, es la radiación pélvica terapéutica empleada, entre otros, en el tratamiento de neoplasias ginecológicas²⁴.

Además, se ha observado una asociación inversa con el consumo de vegetales, fibra y folatos, el uso prolongado de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), el tratamiento con estrógenos, la actividad física²⁵. El consumo de fibra se ha asociado a un menor riesgo de CCR, aunque no se ha visto una relación significativa en análisis multivariantes que consideran otros factores relacionados con la alimentación²⁶. El efecto protector del consumo de fibra puede explicarse por la presencia de anticarcinógenos

vegetales como el folato, la inducción de enzimas de desintoxicación, la unión a carcinógenos luminales, la producción de ácidos grasos volátiles protectores por la fermentación de la fibra o la reducción del tiempo de contacto de los carcinógenos con el epitelio intestinal por el aumento de la velocidad del tránsito²⁷. Numerosos estudios han encontrado que un alto consumo de folatos se asocia con una disminución del riesgo de CCR, proporcionando algunas de las evidencias más directas de las relaciones de factores de riesgo con la dieta²⁸. Los AINEs pueden inhibir la tumorigénesis colorrectal y se encuentran entre los pocos agentes que se sabe que son quimiopreventivos. Ha sido demostrado que los AINEs tienen potentes propiedades antineoplásicas, pero el mecanismo de estos efectos sigue siendo desconocido. Los AINEs actúan mediante dos mecanismos, uno dependiente de la enzima ciclooxigenasa (COX) y otro independiente de COX. Los AINEs pueden inhibir el crecimiento neoplásico al inducir la apoptosis en las células cancerosas. La característica farmacológica más conocida de los AINEs es que inhiben COX, que cataliza la síntesis de prostaglandinas. Varios estudios han demostrado que la inhibición de COX previene la proliferación celular y promueve la apoptosis; se cree que los efectos quimiopreventivos de los AINEs se producen a través de esta vía. Otras observaciones indican que los AINEs también promueven la apoptosis a través de mecanismos que son independientes de la inhibición de COX ya que se han visto efectos quimiopreventivos y proapoptóticos en compuestos estructuralmente similares a los AINEs pero que no inhiben COX²⁹.

1.2.CLÍNICA DEL CCR

La mayoría de pacientes con CCR en estadio temprano son asintomáticos, siendo diagnosticados como resultado de programas de cribado o por la realización de colonoscopias por otros motivos. Aunque la creciente aceptación del cribado de CCR ha llevado un aumento de casos diagnosticados antes de la aparición de manifestaciones clínicas, la mayoría de CCR (70 a 90% de los casos) se siguen diagnosticando después de la presentación de síntomas³⁰, como sangrado rectal y dolor abdominal, entre otros (Tabla 1). La presentación sintomática del CCR generalmente refleja una enfermedad relativamente avanzada, siendo los síntomas más frecuentes la hematoquecia, melenas y la anemia debidas al sangrado del tumor. La sintomatología varía según la localización del tumor, de este modo las lesiones en recto y sigma suelen presentar cambio en los hábitos intestinales, estreñimiento, distensión abdominal, hematoquecia, o tenesmo, mientras que en los tumores derechos es más frecuente una presentación inespecífica con síntomas sistémicos (fatiga, anemia, pérdida de peso), el cambio en los hábitos intestinales o diarrea³¹. Los síntomas obstructivos (distensión abdominal, náuseas y vómitos) son más comunes en tumores que crecen estenosando la luz del intestino, produciendo la denominada descripción de "núcleo de manzana" que se observa en la imagen radiológica, típico de tumores localizados en el lado izquierdo del colon. El dolor abdominal puede ocurrir con tumores que surgen en cualquier localización, el dolor puede ser debido a una obstrucción parcial, una perforación intestinal que conduce a una peritonitis generalizada o una diseminación peritoneal.

Tabla 1. Sintomatología del CCR según la localización anatómica (adaptado de Saidi HS et al.³²).

	Colon derecho	Colon izquierdo	Recto
Número de pacientes	54	59	140
Hemoglobina media al diagnóstico	10.4 g/dL	11.6 g/dL	11.4g/dL
Síntomas al diagnóstico			
Sangrado rectal	21%	44%	79%
Tenesmo	12%	16%	31%
Dolor abdominal	77%	84%	60%
Obstrucción intestinal	15%	27%	44%
Descarga de mucosidad	0%	7%	24%
Cambio de hábitos intestinales	64%	86%	66%

Los pacientes también pueden presentar signos o síntomas de enfermedad metastásica. Aproximadamente el 25-30% de los pacientes presentan metástasis a distancia en el momento del diagnóstico del tumor primario. El CCR puede propagarse vía linfática, hematológica o de manera contigua al peritoneo. Los sitios metastásicos más frecuentes son los ganglios linfáticos regionales. Debido a que el drenaje venoso del tracto intestinal es a través del sistema portal, el primer sitio de diseminación hematológica suele ser el hígado (50% de los casos), seguido por los pulmones (38%) y el hueso (10%)¹⁰. Los tumores que surgen en el recto distal pueden metastatizar inicialmente en los pulmones debido a que la vena rectal inferior drena en la vena cava inferior. La presencia de dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen, la distensión abdominal, la sensación de saciedad temprana, la presencia de una adenopatía supraclavicular o de nódulos periumbilicales a menudo indica una enfermedad diseminada.

1.3. DIAGNÓSTICO

1.3.1. Cribado del CCR

Dada la lenta evolución de las lesiones premalignas a carcinoma y la alta mortalidad del CCR, la posibilidad de diagnóstico temprano y de tratamiento curativo en estadios precoces, hacen que el cribado de este tumor sea de una gran rentabilidad, tanto para el paciente como para el Sistema Nacional de Salud (SNS)^{33,34}.

La aproximación diagnóstica más empleada en el rastreo poblacional de CCR se basa en la detección de sangre oculta en heces (SOH), como manifestación asociada a la presencia del tumor a nivel de la luz intestinal. La SOH se analiza mediante la detección de hemoglobina mediante el análisis de guayaco o empleando técnicas de inmunoquímica. La principal diferencia entre ambas aproximaciones radica en la sensibilidad que presenta cada una de ellas. Así, mientras que el análisis del guayaco se ha asociado a una gran variabilidad en su sensibilidad (13%-79%), las técnicas inmunoquímicas resultan más eficaces, al ser aparentemente más reproducibles y tienen una sensibilidad estable de alrededor del 79% (69%-86%)³⁵. Cuando el resultado del análisis de SOH es positivo es obligada la realización de una colonoscopia para determinar el lugar exacto y la causa del sangrado. Si la colonoscopia de seguimiento es normal, el médico puede recomendar observaciones adicionales con otra prueba de SOH, una evaluación de la parte superior del tracto gastrointestinal, una segunda colonoscopia o una combinación de estas pruebas. El cribado del CCR mediante la detección de la SOH ha demostrado una reducción significativa de la mortalidad en varios estudios randomizados³⁶. La colonoscopia además proporciona el beneficio adicional de la eliminación de pólipos, y está bien establecido que la polipectomía puede prevenir el desarrollo del CCR^{36,37}. De todos los sistemas de cribado del CCR, la Comisión de la Unión Europea recomienda el estudio de SOH³⁸.

Se estima que el 90% de las muertes por CCR se podrían prevenir combinando estrategias dirigidas a mejorar la exploración, el manejo de pólipos y el diagnóstico temprano de la CCR; modificaciones en el estilo de vida, incluyendo cambios dietéticos y aumento del ejercicio; y quimioprevención^{12,29}.

PROGRAMA DE CRIBADO DEL CCR EN CASTILLA Y LEÓN³⁹

El "programa de detección precoz del CCR" en Castilla y León se puso en marcha a finales del año 2013. El objetivo es el de realizar determinaciones de SOH como técnica de cribado de CCR en pacientes sanos (hombres y mujeres). En el inicio el programa fue dirigido a pacientes de edades comprendidas entre los 65 y 69 años (una población que en la comunidad suponía unas 130.000 personas) y planteaba la extensión progresiva para alcanzar la totalidad de la población diana residente en la comunidad de 50 a 69 años. Mediante una carta personalizada y un folleto divulgativo, y a través de los propios centros de salud, sanidad invita a los pacientes susceptibles de participar en el programa de cribado poblacional a realizarse el test de SOH en su centro de salud. Si el resultado de la prueba es negativo, la prueba se repite a los dos años; mientras que si es positivo se deriva al paciente a atención especializada para la realización de una colonoscopia y posterior seguimiento. Además este programa también contempla la formación y sensibilización de los profesionales sanitarios participantes en él.

1.3.2. Pruebas diagnósticas

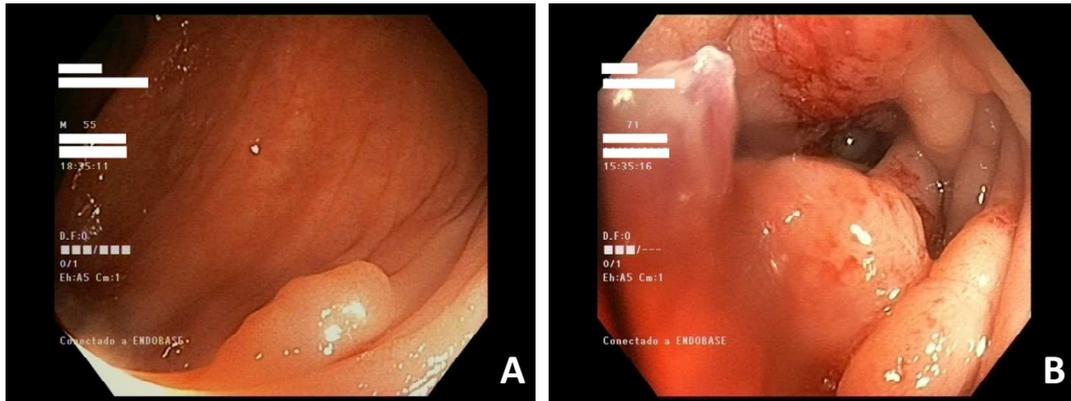
El CCR puede sospecharse ante la presencia de sintomatología asociada, o puede ser asintomático y detectarse mediante pruebas de cribado dirigidas a sujetos de riesgo. Una vez que existe la sospecha de CCR, debe plantearse la realización de una colonoscopia, un enema de bario o una tomografía computarizada (TC). No obstante, los métodos diagnósticos del CCR constituyen un análisis multidisciplinar basado en los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas no invasivas (pruebas diagnósticas de laboratorio y técnicas de imagen), y técnicas invasivas (colonoscopia) para obtener una muestra del tumor, ya que el análisis histopatológico de la muestra tumoral es fundamental para establecer el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

1.3.2.1. Pruebas de imagen

La colonoscopia - constituye la prueba de imagen más habitual ante la presencia de un signo de sospecha de CCR, especialmente en adultos mayores de 50 años, y dentro de estos, en aquellos que presentan SOH y/o niveles séricos del antígeno

carcinoembrionario (CEA) incrementados. La colonoscopia permite visualizar la superficie mucosa del intestino grueso (Figura 3), haciendo posible localizar y biopsiar lesiones de gran tamaño y eliminar pólipos. Con el fin de mejorar el diagnóstico de las lesiones planas se ha desarrollado la cromoendoscopia, que emplea colorantes para mejorar la visualización de las lesiones no sobreelevadas.

Figura 3. Imágenes obtenidas mediante colonoscopia. A: pólipo (lesión sobreelevada y bien circunscrita). B: CCR (lesión de bordes mal definidos, y superficie que muestra irregularidades y zonas de ulceración).



Mediante endoscopia se pueden eliminar las neoplasias colorrectales (adenomas y carcinomas con mínima invasión submucosa) empleando técnicas como la polipectomía y la mucosectomía. Cuando se eliminan por completo lesiones mediante endoscopia, el tatuaje es importante para la localización posterior ya que si se encuentra una neoplasia invasiva facilitará la posterior resección del segmento de colon afectado.

Pruebas radiológicas y de diagnóstico de imagen - la TC y la resonancia magnética (RM) son pruebas de imagen que actualmente se emplean de forma habitual en las fases tempranas del diagnóstico del CCR, se utilizan para evaluar la profundidad de invasión, diseminación regional y metástasis a distancia. La RM rectal es la técnica de referencia para evaluar la extensión local en el cáncer de recto, siendo la ecografía transrectal la alternativa para las lesiones tempranas. La gammagrafía y la tomografía por emisión de positrones también pueden ser utilizadas en el diagnóstico y estadificación del CCR.

1.3.2.2. Pruebas de laboratorio

Marcadores séricos - los niveles de CEA son uno de los marcadores tumorales más estudiados. Se ha demostrado que los pacientes diagnosticados de CCR con niveles de CEA preoperatorio (> 5 ng/mL) tienen peor pronóstico⁴⁰. El CEA también tiene relevancia en el seguimiento de la enfermedad ya que niveles elevados de CEA que no se normalizan después de la cirugía del tumor implican enfermedad persistente, o un aumento de niveles puede indicar recurrencia de la enfermedad⁴⁰. Cabe destacar, que el CEA no es un marcador específico del CCR, también puede encontrarse alterado en otro tipo de tumores como cáncer de páncreas o en EII⁴¹, e incluso en individuos fumadores⁴².

Biopsia líquida - la biopsia líquida de diferentes fluidos biológicos, está siendo considerada en la actualidad como una gran alternativa para el diagnóstico precoz y el seguimiento del CCR⁴³. Se trata de una prueba no invasiva que se realiza en una muestra de sangre periférica (SP) con el fin de buscar células tumorales circulantes (CTCs), fragmentos de ADN, (ADNtc), proteínas o exosomas procedentes de las células tumorales que circulan por la SP⁴⁴.

La detección de CTCs se ha postulado como un parámetro clave para determinar la progresión del tumor así como para establecer la monitorización de los tratamientos. Sin embargo, en el CCR la cantidad de CTCs que se pueden identificar en SP (3 CTCs en 7,5mL) es inferior a la establecida para otro tipo de tumores como el de mama (>5 CTC en 7,5mL)⁴⁵, ya que el hígado actúa como filtro donde se establecen las CTCs. Aún así, la detección CTCs en SP se ha visto relacionada con una menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG)^{43,46}. Una de las limitaciones que presenta la identificación de CTCs en el CCR es la falta de marcadores específicos. En la actualidad, se están desarrollando paneles que combinan marcadores involucrados en la transición epitelio mesénquima (VIM, TWIST1, AKT2 y SNAI1) junto con marcadores epiteliales típicos, EpCAM (CD326) y citoqueratinas, para aumentar la capacidad de identificación de estas células⁴⁷.

La identificación del ADNtc abre una nueva vía para el estudio y seguimiento de la carga tumoral, ya que puede considerarse un biomarcador. El ADNtc puede ser extraído de plasma o suero para la identificación de alteraciones genéticas asociadas al diagnóstico, tratamiento y recurrencia de la enfermedad^{48,49}. Además, el análisis de ADNtc puede proporcionar información de anomalías en los genes involucrados en la patogénesis y

evolución de la enfermedad, tanto del tumor primario como de la metástasis a distancia^{48,50}. Existen numerosos estudios basados en la detección de ADNtc de pacientes con CCR, centrados en la identificación del estado mutacional de los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* implicados en la elección del tratamiento, como veremos posteriormente^{43,51}.

A su vez, el estudio de los exosomas presentes en la SP permite analizar tanto miARN como proteínas⁴³, obteniendo como resultado la identificación de diferentes perfiles de expresión, entre los que cabe destacar la sobre-expresión de MiR-19a asociada a la recurrencia de la enfermedad⁵², otros patrones de expresión asociados al inicio del proceso de invasión tisular⁵³.

Estos resultados preliminares a pesar de ser prometedores aún han de ser validados y superar diversas dificultades tecnológicas para poder ser incluidos en la práctica clínica⁴³.

1.4. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

1.4.1. Lesiones precursoras del CCR

1.4.1.1. Focos de criptas aberrantes

Los focos de criptas aberrantes (Aberrant crypt foci o ACF) son agregados de criptas anómalas presentes en el colon y recto, son frecuentes en relación con neoplasias o a poliposis adenomatosa familiar. Estas lesiones se pueden observar al teñir la mucosa con azul de metileno o examinando la mucosa con un endoscopio de aumento⁵⁴. En el estudio microscópico estas lesiones se caracterizan por presentar criptas aumentadas de tamaño con epitelio engrosado y disminución de la producción de mucina. Se pueden dividir en dos grupos: ACFs con características de pólipos hiperplásicos, asociadas con mutaciones *RAS*, y ACFs con displasia (o micro-adenomas), asociadas con mutaciones a nivel del gen *APC*⁵⁵.

Estudios genéticos de estas lesiones han identificado alteraciones genéticas comunes a los estadios tempranos de la carcinogénesis colorrectal, lo que sugiere que los ACFs podrían ser lesiones precursoras de los adenomas. Sin embargo, hay pocos estudios sobre el significado clínico y el riesgo de progresión de estas lesiones⁵⁶ a nivel intratumoral. La mayoría de los estudios están basados en el análisis de los perfiles de alteraciones genéticas asociadas a distintos diagnósticos histopatológicos (ej. pólipo adenomatoso, adenocarcinoma y adenocarcinoma metastásico), infiriendo estos autores que dichas lesiones constituyen diferentes etapas de desarrollo del tumor^{57,58}.

1.4.1.2. Adenomas

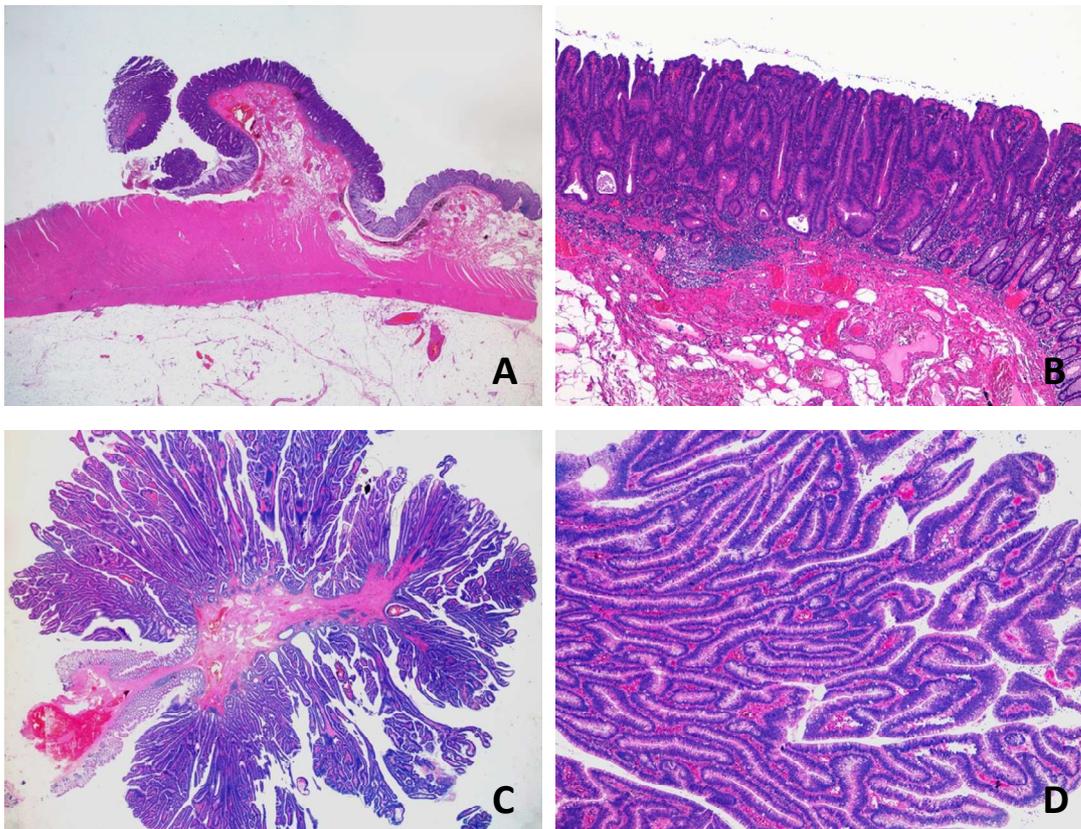
Los adenomas son las lesiones precursoras del CCR^{57,59}. Son frecuentes y casi siempre asintomáticas. Algunos pacientes presentan sangrado rectal manifiesto u oculto, y las lesiones de gran tamaño pueden llevar a anemia por deficiencia de hierro. La importancia clínica de los adenomas está relacionada con su naturaleza premaligna. La prevalencia de adenomas aumenta con la edad; en la quinta década de vida, aproximadamente el 12% de los individuos tienen adenomas, de los cuales una cuarta parte de ellos son considerados lesiones de alto riesgo⁶⁰. La probabilidad de que los adenomas se

desarrollen en un individuo está influenciada por la historia familiar y por diferentes factores nutricionales⁶¹.

Los adenomas se definen morfológicamente como proliferaciones displásicas clonales⁶² del epitelio del colon. De acuerdo a su aspecto macroscópico pueden clasificarse como elevados, ya sean sésiles (sin tallo) o pediculados (con un tallo) y planos. Algunos estudios sugieren que los adenomas planos tienen una mayor incidencia de displasia y carcinoma de alto grado y por lo tanto pueden presentar un mayor riesgo de degeneración maligna⁶³. Sin embargo otros estudios no apoyan esta hipótesis resultando controvertido⁶⁴.

Microscópicamente los adenomas convencionales pueden clasificarse, en función del porcentaje de formación de estructuras tubulares o vellositarias, como tubulares ($\leq 25\%$ de formación de estructuras vellositarias), vellosos ($>75\%$ de formación de vellosidades), o tubulovellosos (cuando contienen entre el 25-75% de vellosidades) (Figura 4). Se ha demostrado que el grado de formación de vellosidades aumenta con el tamaño creciente del adenoma. Aunque en varios estudios se ha observado una correlación entre la histología tubulovellosa o vellosa y posterior desarrollo de CCR⁶⁵ no se ha demostrado que el tipo histológico sea un parámetro predictivo de neoplasia avanzada⁶⁶. Sin embargo, desde el punto de vista del manejo clínico, las lesiones vellosas se siguen considerando como lesiones "avanzadas".

Figura 4. Imágenes histológicas (tinción hematoxilina-eosina) de un adenoma tubular (A-B) y un adenoma vellosa (C-D). A: imagen panorámica de un adenoma tubular. B: detalle a 4x de la arquitectura predominantemente tubular de la lesión. C: imagen panorámica de un adenoma vellosa. D: detalle a 4x de la arquitectura predominantemente vellosa de la lesión.



Histológicamente estas lesiones se definen por la presencia de criptas hipercelulares con displasia. Las células presentan disminución o pérdida de la secreción mucosa, con núcleos que están aumentados de tamaño, son alargados, hipercromáticos y se disponen de manera estratificada y sin polaridad. La displasia puede ser de bajo o alto grado, dependiendo del grado de complejidad glandular, extensión de la estratificación nuclear y la severidad de las anomalías en la morfología nuclear. Cuando, o bien células sueltas, o las glándulas que componen un adenoma invaden la mucosa o muscular de la mucosa sin sobrepasarla, se consideran adenocarcinomas intramucosos (estadio pT1).

1.4.2. Características histopatológicas del CCR^{67,68}

1.4.2.1. Características macroscópicas

El aspecto macroscópico del CCR varía con la historia natural del tumor, por ello depende en gran medida del momento de diagnóstico.

De acuerdo a la apariencia macroscópica, el CCR puede clasificarse en cuatro tipos:

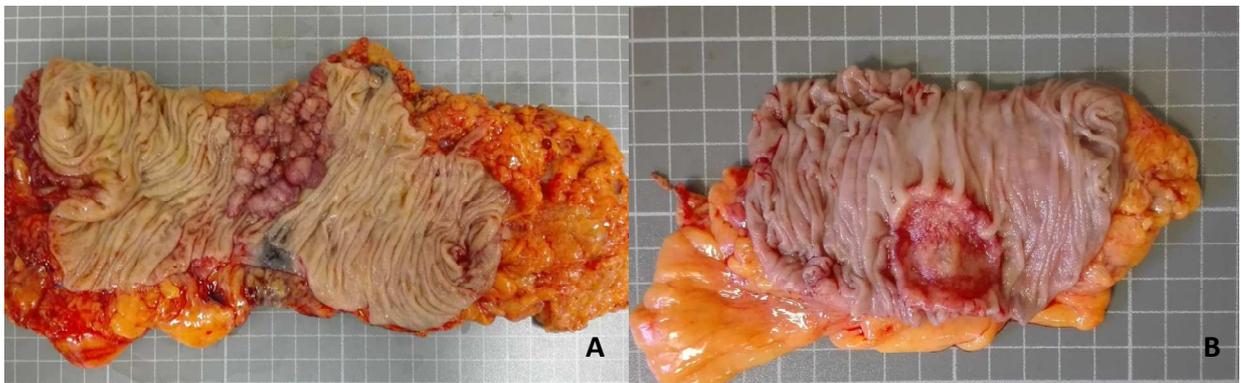
1. Tumores voluminosos, exofíticos y polipoides: Son de crecimiento predominantemente endoluminal y suelen consistir en una masa tumoral unida a la pared por un tallo de menor tamaño. Rara vez resultan en obstrucción y a menudo son de gran tamaño cuando se diagnostican y generalmente de localización derecha (Figura 5A).

2. Tumores infiltrantes y ulcerados: Crecimiento predominantemente intramural; suelen ser lesiones de bordes sobreelevados, irregulares y centro ulcerado que a menudo infiltran capas profundas de la pared intestinal (Figura 5B).

3. Tumores anulares y constrictivos: Crecimiento circunferencial que estenosa la luz intestinal. Se asocian a la característica lesión "corazón de manzana" en los estudios radiográficos y son más frecuentes en el colon transverso e izquierdo.

4. Tumores difusos: producen un aplanamiento difuso de la mucosa colónica. Suelen iniciarse en la mucosa, pero acaban causando afectación transmural. Son tumores análogos a la linitis plástica del estómago.

Figura 5. Imágenes macroscópicas de CCR. A: lesión polipoide exofítica. B: lesión redondeada de bordes sobreelevados y centro ulcerado.



Es frecuente observar superposición entre los diferentes patrones de crecimiento, así como ulceración de la zona central los tumores. El aspecto macroscópico de los tumores no constituye un factor pronóstico independiente⁶⁹.

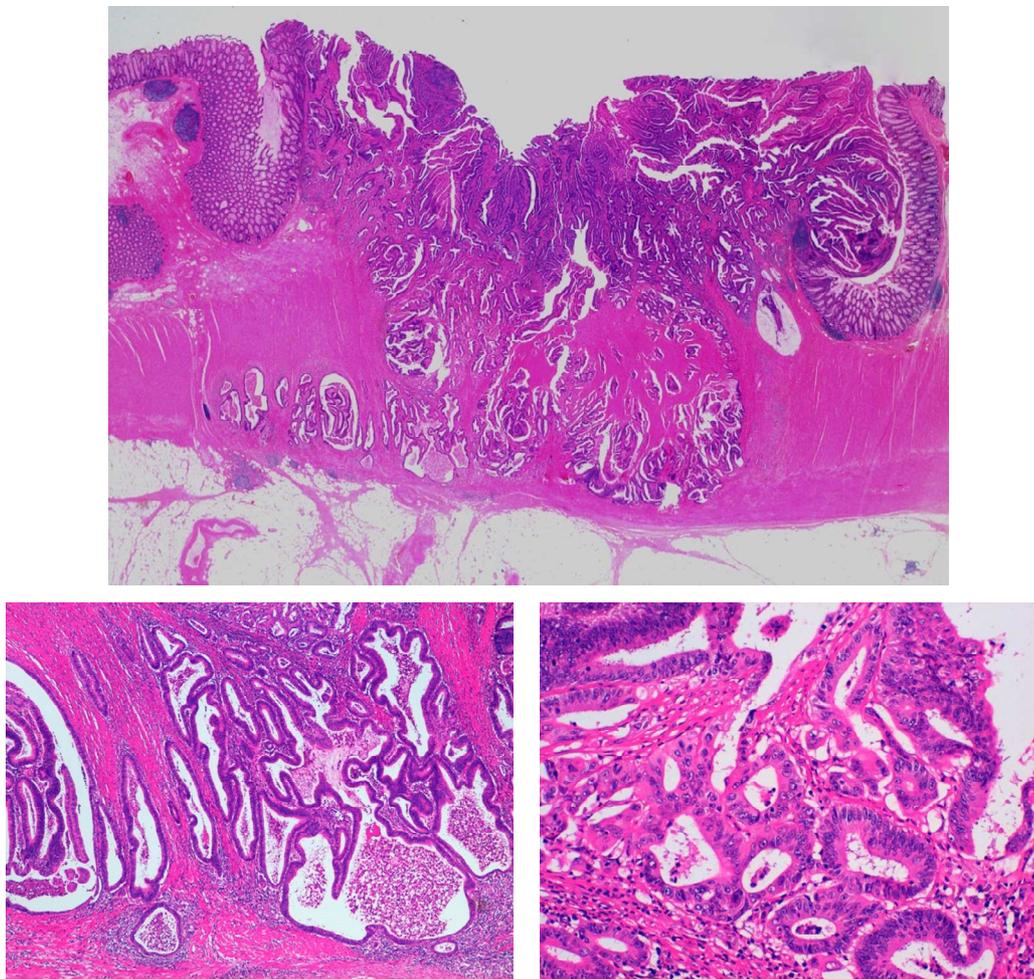
Al corte, la superficie de estos tumores suele ser de aspecto homogéneo y coloración blanca-grisácea, aunque puede ser de aspecto más gelatinoso en tumores mucinosos o bien se pueden visualizar diferentes áreas de necrosis.

1.4.2.2. Características microscópicas

La característica que define el adenocarcinoma colorrectal es la invasión de las glándulas neoplásicas a través de la capa muscular de la mucosa en la submucosa. Los tumores en los que hay invasión pero está limitada a la lámina propia y muscular de la mucosa se denominan "adenocarcinoma intramucoso" y no suelen asociarse con metástasis en ganglios linfáticos, debido a la escasez de vasos linfáticos en la capa mucosa. Por ello, en la octava edición de la clasificación AJCC⁷⁰ la invasión limitada a la mucosa se clasifica como estadio *in situ* o Tis.

La mayoría de los CCR están constituidos por glándulas de tamaño variable formadas por células epiteliales atípicas. Suelen observarse alteraciones de la morfología de las glándulas tales como fusión de glándulas, glándulas incompletas, etc. También es frecuente encontrar numerosas imágenes de mitosis o necrosis (Figura 6).

Figura 6 Imágenes histológicas de un CCR (tinción hematoxilina-eosina). A: imagen panorámica de CCR en el que se observa un lesión que distorsiona la arquitectura mucosa normal e infiltra la pared colónica. B: detalle de estructuras glandulares que muestran una proliferación desorganizada e infiltrativa (4x). C: detalle de glándulas que presentan material necrótico en su interior y se encuentran constituidas por células con atipia citológica (20x).



1.4.2.3. Subtipos histológicos

Desde el punto de vista histopatológico, la OMS clasifica los adenocarcinomas colorrectales en 11 subtipos:

1. Adenocarcinoma tipo usual: constituye más del 90% de CCR⁷¹. Estos tumores están formados por estructuras glandulares de tamaño y configuración variable, a veces de contornos afilados o morfología incompleta, que se disponen de manera desorganizada, siendo frecuente la fusión de glándulas. La luz glandular suele contener moco o restos celulares. Las células epiteliales que forman estas estructuras glandulares suelen ser de tipo columnar alto, con núcleos grandes, cromatina irregular, nucléolo prominente y se pueden observar mitosis abundantes.

2. Adenocarcinoma mucinoso: caracterizado por la presencia de abundante mucina (> 50% de la lesión se compone de mucina). En esta variante se identifican lagos de mucina que contienen fragmentos de epitelio (estructuras acinares, tiras de células o células aisladas). Este tipo histológico se asocia frecuentemente con inestabilidad de microsatélites (MSI). Cuando presentan estabilidad de microsatélites (MSS) o bajos niveles de inestabilidad (MSI-L) se comportan de manera agresiva⁷².

3. Carcinoma de células de anillo de sello: es la variante definida por la presencia de >50% de células tumorales con morfología de células en anillo de sello (células con una vacuola intracitoplasmática de mucina que desplaza el núcleo). Las células en anillo de sello pueden presentarse en lagos de mucina o de manera infiltrativa en la pared colónica con escasa mucina extracelular. Los CCR que presentan <50% de células con morfología en anillo de sello, deben ser denominados “CCR con componente de células en anillo de sello”.

4. Carcinoma medular: variante que se caracteriza por la presencia de nidos de células de aspecto sincitial (con núcleos vesiculares, nucléolo pequeño y citoplasmas eosinófilos amplios) con un marcado infiltrado inflamatorio linfocitario peri e intratumoral. Es un tumor más frecuente en mujeres, en colon derecho y se asocia a buen pronóstico. Estos tumores con frecuencia presentan MSI.

5. Adenocarcinoma serrado: variante infrecuente que arquitecturalmente se parece a los pólipos serrados tradicionales, ya que está constituido por glándulas que presentan serración con células con núcleos basales y citoplasmas eosinófilos. Se cree que estos tumores están relacionados con los adenomas serrados y pueden ser más agresivos que el adenocarcinoma de tipo usual⁷³. Estos tumores suelen presentar inestabilidad de microsatélites, mutaciones de *BRAF* e hipermetilación de islas CpG.

6. Adenocarcinoma cribiforme: se encuentra formado por glándulas cribiformes con necrosis central que recuerdan a las del carcinoma ductal de mama. Estos tumores suelen presentar MSS e hipermetilación de islas CpG.

7. Adenocarcinoma micropapilar: variante infrecuente constituida por pequeños agregados de células que presentan una hendidura entre ellos y el estroma. Este tipo histológico se asocia a invasión linfovascular y metástasis ganglionares⁷⁴.

8. Carcinoma adenoescamoso: son tumores inusuales que muestran características tanto de carcinoma escamoso como de adenocarcinoma, y pueden presentarse como áreas separadas o mezcladas. El carcinoma epidermoide puro es muy infrecuente en el intestino grueso.

9. Carcinoma fusocelular: tumor bifásico que presenta un componente de células sarcomatoides que son, al menos de manera focal, positivas en el estudio inmunohistoquímico para queratinas.

10. Carcinoma indiferenciado: son tumores que carecen de otra diferenciación (histológica o inmunohistoquímica) más allá de la de ser tumores epiteliales.

11. Otras variantes: variantes raras de CCR incluyen el carcinoma de células claras, el coriocarcinoma o el carcinoma papilar rico en células de Paneth.

1.4.2.4. Clasificación histopatológica

La gradación histológica del CCR es una variable muy utilizada. A pesar de ser difícil de definir, y de la variabilidad interobservador⁷⁵, en diferentes estudios se ha visto que el grado histológico es un factor pronóstico, encontrándose correlación sobre todo entre grados pobremente diferenciados y el pronóstico adverso^{76,77}.

Los adenocarcinomas se clasifican en función del porcentaje de formación de glándulas (frente a áreas de tumor sólido o nidos o cordones de células tumorales). El grado se puede estratificar según diferentes sistemas. Existen sistemas de tres grados, que distinguen entre tumores bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados; o sistemas de dos grados que clasifican en bajo grado (que incluye tumores bien y moderadamente diferenciados) y de alto grado (adenocarcinomas poco diferenciados e indiferenciados). No obstante, la octava edición del manual de la AJCC para la estadificación del CCR⁷⁰ especifica que debe utilizarse una clasificación de cuatro niveles de diferenciación:

Bien diferenciado (grado 1): presencia de estructuras glandulares en >95% del tumor.

Moderadamente diferenciado (grado 2): presencia de 50-95% de glándulas.

Pobremente diferenciado (grado 3): formación de glándulas en 0-49% del tumor.

Indiferenciado (grado 4): tumores en los que no hay formación de glándulas ni evidencia de producción de mucina.

La gradación histológica sólo se aplica a los adenocarcinomas de tipo usual. El adenocarcinoma mucinoso y el carcinoma de células de anillo de sello se consideran variantes pobremente diferenciadas (grado 3). Los carcinomas medulares, a pesar de no formar glándulas, no deben clasificarse como pobremente diferenciados ya que se asocian con un buen pronóstico⁷⁸,

Cuando en un tumor se observan diferentes áreas con distintos grados histológicos la clasificación debe realizarse en función del componente menos diferenciado, aunque no debe considerarse a la hora de establecer el grado histológico el frente de la invasión, ya que en estas áreas son frecuentes los focos de tumor poco diferenciados.

Asimismo, no sólo es importante la profundidad y extensión de la neoplasia, sino las características de este borde infiltrante. En este sentido, se denomina "*tumor budding*" a la capacidad de una neoplasia de poder infiltrar en forma de células tumorales sueltas, nidos o cordones en grupos de menos de cinco células (*buds*) en el frente tumoral, y es un factor independiente de mal pronóstico⁷⁹. En base a estudios retrospectivos bien diseñados, el *tumor budding* ha demostrado ser un predictor de riesgo adverso en CCR en tres contextos clínicos concretos: i).- pólipos malignos, donde la presencia de *tumor budding* es un predictor de metástasis ganglionares e indica la necesidad de realizar resecciones quirúrgicas; ii).- tumores en estadio II, donde es un indicador pronóstico adverso que puede contribuir en la selección de pacientes para terapia adyuvante; y iii).- en el entorno preoperatorio, donde la presencia de *tumor budding* puede ayudar a la selección de pacientes con cáncer rectal de alto riesgo que requieren terapias neoadyuvantes⁸⁰. De todos modos, en la actualidad se recomienda que esta característica se informe en los adenocarcinomas que surgen en pólipos y en los estadios I y II de la enfermedad.

1.5. ESTADIAJE TNM DEL CCR. CLASIFICACIÓN Y ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA DE LA ENFERMEDAD.

El estadio patológico (pTNM) se refiere a la extensión del tumor y es el principal factor pronóstico del CCR⁷⁰. El pronóstico de los pacientes con CCR se relaciona con la profundidad de la invasión tumoral (definida como "T"). En el CCR, a diferencia de otros carcinomas como la mama o el pulmón, la variable T no se basa en tamaño propio del tumor, sino en el grado de infiltración de las estructuras de la pared colónica. Así, las lesiones que presentan invasión de la lámina propia o de la muscular de la mucosa (sin sobrepasarla), se incluyen en la categoría *Tis*. Los adenocarcinomas invasivos que infiltran la submucosa corresponden con estadios T1; son T2 cuando invaden la capa muscular propia; T3 cuando infiltran la subserosa o tejido adiposo no peritonealizado y T4 cuando alcanzan el peritoneo (T4a) o infiltran órganos o estructuras adyacentes (T4b). La afectación del peritoneo es un factor de mal pronóstico ya que se asocia a carcinomatosis peritoneal y a recurrencia del tumor. La invasión peritoneal debe diagnosticarse cuando se vean células tumorales en la superficie peritoneal, o cuando se encuentren en la superficie serosa inflamación, erosión o ulceración relacionadas con el tumor⁸¹.

En el CCR la afectación ganglionar se evalúa mediante estudio histológico de los ganglios linfáticos regionales aislados en la grasa pericolónica o perirrectal de una pieza de resección quirúrgica. El estadio patológico ganglionar (pN) tiene importancia tanto pronóstica como terapéutica. Deben analizarse al menos 12 ganglios linfáticos para un adecuado estadiaje del tumor. La presencia de nódulos tumorales de bordes irregulares localizados en la grasa pericolónica o perirrectal, lejos del margen infiltrativo del tumor, sin evidencia de tejido linfático residual y dentro del drenaje linfático regional del tumor, deben incluirse en la categoría N como "Nc" siempre y cuando no haya evidencia de ganglios linfáticos metastásicos. Se define como "células tumorales aisladas" a la presencia de células tumorales sueltas o grupos de células < 0,2mm, en los ganglios linfáticos, y que se suelen detectar por técnicas de inmunohistoquímica. Cabe destacar, que la presencia de estos pequeños focos de tumor en los ganglios debe clasificarse como "pN0", ya que no se ha demostrado su importancia pronóstica⁸² (Tabla 2 y Tabla 3)

Las metástasis más frecuentes del CCR son de localización hepática. Aproximadamente entre el 25 y el 30% de los pacientes con CCR presentan metástasis hepáticas en el momento del diagnóstico y un 20% de pacientes desarrollan metástasis hepáticas después del tratamiento de su tumor primario⁸³.

Tabla 2. Clasificación TNM del CCR (adaptado de 8ª edición AJCC Cancer Staging Manual⁷⁰)

TUMOR PRIMARIO (pT)
TX: el tumor primario no se puede evaluar
T0: sin evidencia de tumor primario
Tis: carcinoma in situ, carcinoma intramucoso (afectación de la lámina propia sin extensión a través de la mucosa muscular)
T1: el tumor invade la submucosa (a través de la muscular de la mucosa pero no en la muscular propia)
T2: tumor invade la muscular propia
T3: el tumor invade a través de la muscular propia en los tejidos pericorectales
T4a: el tumor invade a través del peritoneo visceral (incluida la perforación macroscópica del intestino a través del tumor y la invasión continua del tumor a través de áreas de inflamación a la superficie del peritoneo visceral)
T4b: el tumor invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras adyacentes
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (pN)
NX: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0: sin metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1: metástasis en 1 - 3 ganglios linfáticos regionales
N1a: metástasis en 1 ganglio linfático regional
N1b: metástasis en 2 - 3 ganglios linfáticos regionales
N1c: no hay ganglios linfáticos regionales positivos, pero hay depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirectales no peritonealizados
N2: metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
N2a: metástasis en 4 - 6 ganglios linfáticos regionales
N2b: metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales
METÁSTASIS A DISTANCIA (pM)
M0: ninguna metástasis a distancia por imágenes; no hay evidencia de tumor en otros sitios u órganos (esta categoría NO es asignada por patólogos)
M1: metástasis a distancia
M1a: metástasis confinada a 1 órgano o sitio sin metástasis peritoneal
M1b: metástasis a 2 o más sitios u órganos sin metástasis peritoneal
M1c: metástasis a la superficie peritoneal sola o con otras metástasis a órganos.

Tabla 3. Estadaje del CCR (adaptado de 8° edición AJCC Cancer Staging Manual70).

	T	N	M
ESTADIO 0	Tis	N0	M0
ESTADIO I	T1-T2	N0	M0
ESTADIO II			
ESTADIO IIA	T3	N0	M0
ESTADIO IIB	T4a	N0	M0
ESTADIO IIC	T4b	N0	M0
ESTADIO III			
ESTADIO IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
ESTADIO IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
ESTADIO IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
ESTADIO IV			
ESTADIO IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
ESTADIO IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b
ESTADIO IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c

1.6. TRATAMIENTO DEL CCR

En el tratamiento del CCR se combinan acciones quirúrgicas destinadas a la resección de la mayor cantidad de células tumorales, y acciones médicas destinadas a destruir y/o controlar la progresión tumoral. Para un adecuado tratamiento sigue siendo indispensable una rigurosa estadificación, clínica y/o anatomopatológica tanto pre como postquirúrgica, en caso de realizarse intervención.

En líneas generales, el tratamiento quirúrgico es de elección en los estadios precoces, mientras que los estadios avanzados o metastásicos requieren terapias quirúrgicas, en combinación con agentes quimioterapéuticos (quimioterapia convencional o terapias dirigidas) e inmunológicas.

1.6.1. Tratamiento quirúrgico

1.6.1.1. Manejo de adenocarcinomas sobre pólipos

La mayoría de los cánceres de colon surgen de adenomas. Los adenomas convencionales y aquellos con displasia de alto grado (sin evidencia de cáncer invasivo), pueden ser manejados eficazmente mediante la resección endoscópica (polipectomía). La resección endoscópica es también una alternativa a la cirugía radical para los CCR de bajo riesgo que surgen en un pólipo. La presencia de una histología poco diferenciada, invasión linfovascular, células tumorales en el margen de resección o células tumorales a menos de 2mm del margen, debe llevar a la consideración de la cirugía radical, ya que indican un mayor riesgo de cáncer residual y/o metástasis en ganglios linfáticos.

1.6.1.2. Manejo de la enfermedad localizada

La resección quirúrgica es la forma primaria de tratamiento para el CCR localizado, pudiendo estar indicada en pacientes con enfermedad metastásica resecable localizada en el hígado y/o pulmón. Los pacientes con metástasis irresecables no suelen ser candidatos a cirugía del tumor primario salvo que tengan complicaciones por el propio

tumor (obstrucción, perforación, etc.). Algunos pacientes tampoco pueden ser candidatos a cirugía por la presencia de comorbilidades médicas.

Los objetivos de la resección quirúrgica son la extirpación completa del tumor junto con el pedículo vascular y la región de drenaje linfático del segmento afectado. La resección se puede llevar a cabo mediante cirugía abierta o laparoscopia. La colectomía laparoscópica suele aplicarse a pacientes con cáncer de colon no obstruido, no perforado, no avanzado localmente y que no han tenido una cirugía abdominal extensa previa. Con la cirugía laparoscópica, los pacientes obtienen resultados oncológicos comparables a la cirugía abierta, con una morbilidad y mortalidad perioperatoria menor y una recuperación más rápida. La situación clínica específica a menudo dicta el enfoque quirúrgico (por ejemplo, electiva versus colectomía urgente por complicaciones del tumor).

1.6.1.3. Manejo de la enfermedad localmente avanzada

Aproximadamente el 10% de pacientes con CCR presentan invasión de órganos contiguos o adherencias a estructuras próximas. En estos casos las diferentes guías indican la resección quirúrgica "en bloque", con resecciones multiviscerales con márgenes quirúrgicos negativos (R0) de las estructuras adyacentes^{84,85}. Los pacientes que no son candidatos a resecciones curativas, se pueden beneficiar de cirugías paliativas para el tratamiento de síntomas asociados al tumor primario (obstrucción, sangrado, etc.).

1.6.1.4. Manejo quirúrgico de la enfermedad metastásica

Aproximadamente el 20% de tumores de colon son metastásicos en el momento del diagnóstico. Las localizaciones más frecuentes de las metástasis son el hígado, los pulmones y el peritoneo. La diseminación metastásica del tumor primario, principalmente al hígado, es la principal causa de muerte en pacientes con CCR⁸⁶. Aunque la quimioterapia ha mejorado la supervivencia de estos pacientes, ésta es muy baja a menos que se realice resección o ablación de las metástasis. Por ello, la cirugía es una opción potencialmente curativa en pacientes con enfermedad metastásica localizada (predominantemente en el pulmón o el hígado). En el caso de pacientes que se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad, particularmente cuando presentan metástasis sincrónicas, la resección de éstas últimas supone un aumento de la SG a 5 años de entre 46% y 58%⁸⁷.

1.6.2.Tratamiento quimioterápico

1.6.2.1. Quimioterapia Neoadyuvante

El consenso del National Comprehensive Cancer Network (NCCN)⁸⁴ recomienda el uso de quimioterapia en aquellos pacientes con tumores localmente irresecables o no operables por contraindicaciones médicas.

1.6.2.2. Quimioterapia adyuvante

El objetivo de la quimioterapia postoperatoria (adyuvante) es erradicar micrometástasis, reduciendo así la probabilidad de recurrencia de la enfermedad y aumentando la tasa de curación en pacientes que han sufrido una resección potencialmente curativa. Los beneficios de la quimioterapia adyuvante han sido más claramente demostrados en pacientes con enfermedad en estadio III (ganglios positivos), mostrando una reducción de aproximadamente 30% en el riesgo de recurrencia de la enfermedad y una disminución entre el 22 al 32% en la mortalidad, con los tratamientos quimioterápicos actuales. En pacientes con ganglios positivos se recomienda un tratamiento de 6 meses con oxaliplatino. Los resultados de la quimioterapia adyuvante en pacientes con ganglios negativos son controvertidos y la decisión terapéutica debe tener en cuenta características clinicopatológicas de alto riesgo (menos de 12 ganglios aislados, tumor T4, perforación u obstrucción, histología poco diferenciada, invasión linfovascular o perineural).

1.6.3.Tratamiento radioterápico. Radioterapia postoperatoria y quimiorradioterapia neoadyuvante

La radioterapia postoperatoria no suele emplearse en el tratamiento del cáncer de colon resecado por completo. Algunos pacientes con cáncer de colon con alto riesgo de recurrencia local (márgenes de resección positivos, perforación o formación de abscesos, enfermedad T4) pueden beneficiarse del tratamiento radioterápico⁸⁴. En cambio, en pacientes con cáncer de recto la radioterapia adyuvante está indicada para el tratamiento tanto de la enfermedad transmural como para la presencia de metástasis ganglionares.

La quimiorradioterapia neoadyuvante (preoperatoria) en lugar de la cirugía inicial es común en el tratamiento del cáncer rectal localmente avanzado. En el caso del cáncer de colon, hay pocos datos sobre los beneficios que puede aportar la quimiorradioterapia adyuvante⁸⁸. Podría considerarse en pacientes con cáncer de colon localmente avanzado con invasión en los órganos adyacentes. La quimioterapia administrada simultáneamente a la radioterapia proporciona actividad antitumoral sinérgica pero también aumenta la toxicidad relacionada con el tratamiento.

1.6.4. Terapias dirigidas

Desde mediados de la década de 2000, se han desarrollado diferentes agentes biológicos con el fin de combatir de manera específica cambios de los genes y de las proteínas celulares que originan la neoplasia. Estos nuevos tratamientos han demostrado un mayor beneficio clínico en combinación con la quimioterapia citotóxica convencional para el tratamiento del CCR metastásico, aumentando la mediana de SG en aproximadamente 2 años. Se pensaba que las terapias dirigidas contra el cáncer serían menos tóxicas que los fármacos tradicionales de quimioterapia ya que éstas actúan específicamente sobre las alteraciones moleculares presentes en las células neoplásicas. No obstante, las terapias dirigidas contra el cáncer pueden tener efectos secundarios importantes, siendo los más comunes la diarrea y problemas de hígado, como hepatitis y elevación de enzimas hepáticas. Se pueden usar en combinación con quimioterapia convencional o en monoterapia en los casos en los que la quimioterapia ya no es eficaz. Los agentes biológicos que han demostrado beneficios clínicos en CCR metastásico van dirigidos principalmente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)⁸⁹.

1.6.4.1. Medicamentos que atacan la formación de vasos sanguíneos (anti-VEGF)

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una proteína que participa en la angiogénesis de los tumores. En la actualidad existen diferentes fármacos que inhiben la función de esta proteína, tales como el Bevacizumab, Ramucirumab y Ziv-

aflibercept. Se ha visto que los agentes antiangiogénicos no solo inhiben la angiogénesis tumoral sino que también normalizan los vasos sanguíneos del tumor, lo que mejora la administración del fármaco al tumor y la eficacia de los agentes citotóxicos.

1.6.4.2. Medicamentos que atacan a la vía de señalización de EGFR (anti-EGFR)

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína transmembrana con función tirosín-quinasa. La expresión de EGFR activa diferentes rutas de señalización que incluyen RAS/RAF/MAPK, STAT y PI3K/AKT. La activación de esta última vía modula la proliferación celular, la adhesión, la angiogénesis, la migración y la diseminación metastásica.

Cetuximab y Panitumumab son anticuerpos monoclonales anti-EGFR. En la actualidad, el uso de estos fármacos está restringido solo a pacientes con CCR metastásico con *KRAS* y *NRAS* en estado nativo (WT).⁹⁰.

1.6.5. Inmunoterapia

La inmunoterapia o terapia biológica consiste en el empleo de medicamentos que ayudan al sistema inmunitario del paciente a reconocer y destruir a las células tumorales.

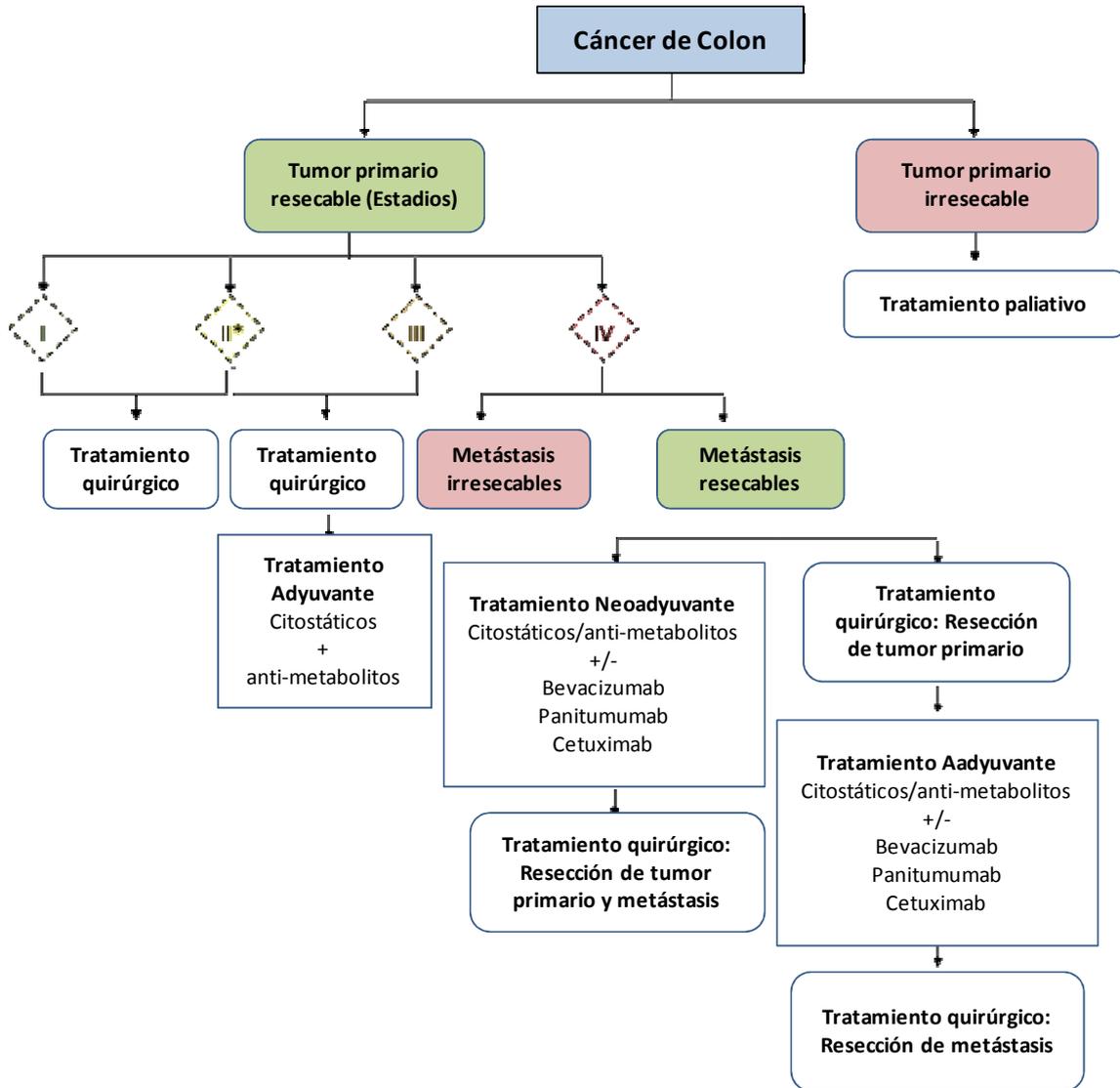
Las inmunoterapias actuales para el CCR se dividen en siete categorías: inhibidores de puntos de control e inmunomoduladores, bloquean moléculas que sirven como controles en las respuestas inmunes o activan moléculas estimuladoras, mejorando la respuesta inmunitaria al cáncer; anticuerpos monoclonales, moléculas generadas de manera artificial que se dirigen a los antígenos específicos de los tumores; vacunas terapéuticas o vacunas contra el cáncer, diseñadas para provocar una respuesta inmune contra antígenos específicos del tumor, estimulando al sistema inmunitario a atacar las células neoplásicas), terapia de células adoptivas, que consiste en eliminar de un paciente las células inmunitarias, se modifican genéticamente o se tratan con productos químicos para mejorar su actividad, se reintroducen en el paciente con el objetivo de mejorar la respuesta antitumoral del sistema inmune; terapia con virus oncolíticos, se introduce un

virus modificado que puede causar que las células tumorales se autodestruyan y generen una mayor respuesta inmune; inmunoterapias adyuvantes, son sustancias que se usan solas o combinadas con otras inmunoterapias para estimular la respuesta inmune; y citoquinas, moléculas mensajeras que ayudan a controlar el crecimiento y la actividad de las células del sistema inmunitario.

La mayoría de estas terapias aún se encuentran en fase inicial de pruebas clínicas (fase I y II) para el CCR, pero su uso con éxito en otros tipos de tumores sugiere que también pueden resultar útiles para el CCR. De hecho, varios estudios han relacionado la respuesta frente a estos fármacos con tumores que tienen una o dos características genéticas que impiden a las células reparar el ADN dañado: deficiencia en la reparación de los errores de emparejamiento (dMMR) y/o inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H). Este hecho se debe a que los tumores que tienen alguna de esas dos características genéticas tienden a presentar índices altos de mutaciones en el ADN. Algunas de esas mutaciones pueden causar la producción de muchos antígenos anómalos que pueden ser atacados por las células inmunitarias⁹¹, de forma que aumenta la infiltración del tumor por linfocitos T citotóxicos⁹², y por lo tanto, la desinhibición de la respuesta de las células T antitumorales.^{93,94}

En la actualidad la elección del protocolo terapéutico a seguir en pacientes con CCR requiere de algoritmos que hagan que este sea el más adecuado para cada paciente. En la Figura 7 se recoge de forma esquemática un algoritmo terapéutico que incluye las variables y aproximaciones más relevantes a tener en cuenta en la toma de decisiones terapéuticas en el CCR.

Figura 7. Algoritmo terapéutico para el cáncer de colon según el estadio al diagnóstico



1.7. FACTORES PRONÓSTICOS

Los principales factores que indican pronóstico adverso establecidos por la OMS para el CCR se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales factores pronósticos del CCR (adaptado de OMS⁶)

	FACTOR PRONÓSTICO	CARACTERÍSTICA ADVERSA
Características del tumor primario	Diagnóstico TNM Tamaño del tumor Morfología del tumor Patrón histológico Perfiles de invasión Grado de diferenciación	Presencia T4, N1,2,3 y/o M1 Obstrucción de la luz intestinal Presencia de ulceraciones o perforaciones tumorales Tumores mucinosos Presencia de invasión linfática, vascular y neural Tumores pobremente diferenciados
Técnicas quirúrgicas empleadas	Tamaño de la pieza resecada Resección	Longitud de la pieza de 2-5cm R1, R2
Marcadores Moleculares	CEA MSI BRAF Enzimas encargadas de la matriz extracelular Moléculas de adhesión	Niveles elevados en sangre periférica MSI-bajo Mutación V600E Sobreexpresión de Metaloproteasas, uroquinasas Sobreexpresión de CD44, ICAM-1

El principal factor pronóstico de la enfermedad es el estadio del tumor, determinado por el grado de penetración del tumor en la pared intestinal (pT), la afectación metastásica ganglionar (pN) y/o de otros tejidos. En aquellos casos en los que se detectan metástasis sincrónicas, es de gran importancia establecer las características de estas lesiones que pueden aportar valor pronóstico en el CCR^{87,95}. Así, la literatura muestra que el número de focos metastásicos detectados constituye un importante factor pronóstico en pacientes con CCR metastásico⁸⁷, habiéndose observado que más de 4 lesiones metastásicas conllevan una disminución en la SG de los pacientes CCR⁹⁶.

El estudio histológico de los márgenes de resección tanto del tumor como de sus metástasis es el principal factor para la evaluación de la eficacia de la intervención quirúrgica. Así, podemos determinar 3 tipos de resección: R0 en la que no se observan células tumorales en los márgenes de la pieza, R1 donde se aprecian en el estudio microscópico células tumorales en los márgenes y R2 cuando se observa macroscópicamente tumor residual. La determinación de R1 y R2 está directamente relacionado con la aparición de recidivas tumorales así como con tiempos de SLE y de SG más cortos^{87,95,96,97}.

Además de los parámetros mencionados, el estudio histopatológico del tumor, suele incluir el análisis del patrón de alteración de MSI, que constituye otro factor pronóstico en pacientes con CCR. Así, la identificación de MSI elevada se asocia a un buen pronóstico ya que estos casos presentan una menor tasa de recurrencia y mayor SG^{98,99}.

A nivel molecular, algunas mutaciones genéticas como las que afectan al gen *BRAF*, son también importantes a la hora de establecer el pronóstico de la enfermedad. *BRAF*, es una de las proteínas involucradas en vía de señalización MAP/ERK efectora de EGFR, receptor diana de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR empleados en el tratamiento del CCR metastásico. La detección de la mutación V600E (la más frecuentemente detectada en *BRAF*, 95%) tiene lugar en el 20% de los CCR y está directamente asociada con la respuesta al tratamiento y constituye por sí misma un factor pronóstico adverso ya que se asocia a periodos cortos de SLE y SG^{100,101}. Existe una fuerte asociación entre la presencia de la mutación V600E y la MSI, diferentes estudios han identificado esta mutación en el 60% de los casos con MSI elevada frente al 10% de MSI baja^{102,103}.

Recientemente, se ha hecho hincapié en la importancia que tiene en la biología del CCR las células inmunitarias infiltrantes del tumor, emergiendo como factores pronósticos el recuento de las diferentes poblaciones celulares y los ratios entre ellas. Así, se ha establecido que bajos ratios linfocitos-monocitos se relacionan con un pronóstico adverso¹⁰⁴. El análisis de las diferentes subpoblaciones de linfocitos infiltrantes^{105,106} indican que la presencia de gran densidad de linfocitos T reguladores (Treg)^{107,108} se asocia con bajas tasas de SLE, mientras que la presencia de linfocitos T “citotóxicos” se asocia con un pronóstico favorable^{106,108}.

2. GENÉTICA DEL CCR

2.1. SUBTIPOS GENÉTICOS DE CCR

Basándonos en la genética del tumor, podemos distinguir dos grandes grupos: CCR hereditario o familiar y CCR esporádico^{6,109}.

2.1.1. CCR hereditario

El grupo de los adenocarcinomas hereditarios o con antecedentes familiares constituye un 10-15% de todos los CCR de nuevo diagnóstico⁶. En esta categoría se engloban diferentes síndromes, cada uno de ellos asociado con alteraciones genéticas germinales que conllevan una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad¹¹⁰. Estos síndromes se clasifican en cuatro grupos^{6,111,112}.

CCR hereditario no polipósico (CCHNP) o Síndrome de Lynch. Es más frecuente de los CCR hereditarios, y supone aproximadamente un 5-8%¹¹³ del total de CCR que se diagnostican. El origen de esta enfermedad radica en la presencia de defectos en el sistema de reparación de los errores de replicación del ADN¹¹⁴. La principal causa de esta deficiencia es la aparición de mutaciones germinales autosómicas dominantes en cinco genes: i) el gen MutS Homolog 2 (*MSH2*) localizado en la región cromosómica 2p21; ii) el gen MutL Homolog 1 (*MLH1*) codificado en 3p31-p23; iii) el gen de segregación postmeiótica tipo 1 (*PSM1*) a nivel de 2q31-q33; el gen de segregación postmeiótica tipo 2 (*PSM2*) en 7p22; y, v) el gen homólogo de MutS tipo 6 (*MSH6*) codificado en la región cromosómica 2p21^{115,116}. Las alteraciones de estos genes están asociadas a la pérdida de funcionalidad de las proteínas que codifican (encargadas corregir errores durante la replicación del ADN) lo que conllevan la aparición de inestabilidad de microsatélites (MSI) así como una inestabilidad genómica generalizada^{114,117}.

Síndromes polipósicos: Este subgrupo supone menos del 1% del total de CCR que se diagnostican^{113,118}. Genéticamente se caracterizan por la presencia de mutaciones germinales autosómicas dominantes del gen *APC* (Adenomatous Poliposis Coli),

localizado a nivel de la región cromosómica 5q21-22 y se ha identificado una mutación germinal del gen *APC* en el 60-80% de las familias¹¹⁹. Se han detectado multitud de mutaciones en los diferentes codones que constituyen el gen asociadas a diferentes síndromes polipósicos, siendo las más frecuentes las deleciones e inserciones de pares de bases que conllevan cambios en el marco de lectura del gen, obteniendo como resultado final proteínas truncadas^{112,113,120}. Desde el punto de vista funcional, el gen *APC* está implicado en números procesos celulares relacionados con la vía de señalización WNT/ β -catenina¹²¹, en la que *APC* interviene como molécula inhibitoria. Así, la pérdida de funcionalidad de esta proteína conlleva la activación de esta vía que tiene como resultado la activación de diferentes genes diana, entre los que se encuentran el oncogén *C-MYC*, promoviendo la proliferación celular¹¹². La Polidposis Adenomatosa Familiar (FAP) es un trastorno genético autosómico dominante caracterizado por el desarrollo de cientos a miles de adenomas tanto en la adolescencia como en la edad adulta. La poliposis adenomatosa familiar se debe a la herencia de una copia mutada (funcionalmente inactiva) del gen *APC*, y posteriormente se adquiere la mutación de la segunda copia.

Síndromes polipósicos hamartomatosos. Este grupo engloba síndromes raros, caracterizados por presentar hamartomas en diferentes localizaciones anatómicas, además de las intestinales. Estas patologías se caracterizan por presentar mutaciones autosómicas dominantes en diferentes genes supresores tumorales, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Características genéticas y moleculares de los Síndromes polipósicos hamartomatosos y sus efectos.

SÍNDROME	GEN ALTERADO	RUTA DE SEÑALIZACION AFECTADA	REFERENCIAS
Peutz-Jeghers	<i>LKB1</i>	Vía de TP53	111 112 113 122 123 124 , , , , ,
Cowden	<i>PTEN</i>	Vía AKT/PI3K	109 111 112 113 124 125 , , , , ,
Poliposis Juvenil	<i>SMAD4</i>	Vía TGF- β	111 112 113 124 126 , , , ,

Otros síndromes hereditarios. En este grupo se engloban patologías en las que la alteración genética causante de CCR no se encuentra en un modo de herencia dominante sino recesiva como ocurre en el CCR familiar tipo X, caracterizado clínicamente por presentar las mismas características que el Síndrome de Lynch pero sin tener alterado el sistema de reparación de los errores de replicación del ADN^{127,128}. Diferentes

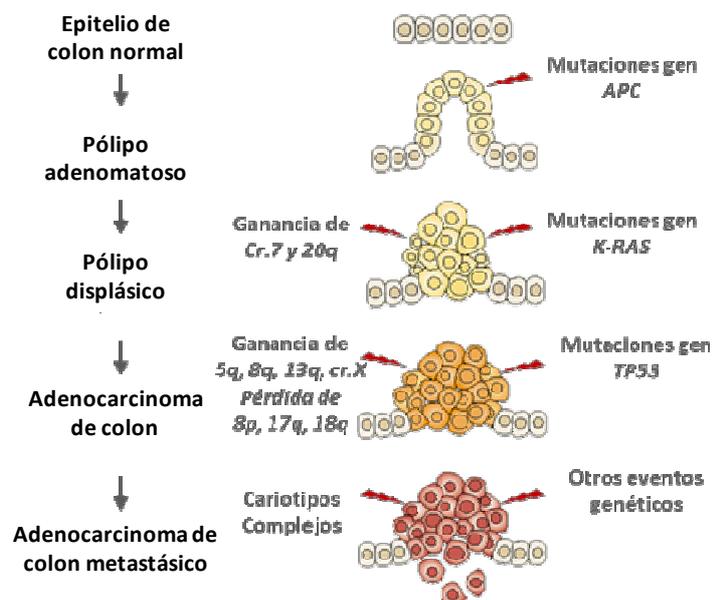
investigaciones han identificado la presencia de mutaciones en genes supresores tumorales como *RASSF9* así como alteraciones citogenéticas en 12p21 en las que se encuentran localizados diferentes genes asociados con la proliferación celular como *NTS*¹²⁹.

Cabe destacar que todas las alteraciones genéticas hereditarias descritas anteriormente pueden aparecer de forma puntual en los adenocarcinomas de colon esporádicos participando activamente en el proceso de carcinogénesis y progresión del tumor.

2.1.2.CCR esporádico

El CCR esporádico es el subtipo genético más prevalente, constituyendo el 80% de todos los diagnósticos⁶. El desarrollo de la patología, partiendo de células epiteliales normales hasta la aparición del adenocarcinoma colorrectal, conlleva la acumulación de múltiples alteraciones en el material genético celular, todas ellas asociadas con cambios histológicos, cuyo único fin es desequilibrar la balanza proliferación celular vs apoptosis. Los primeros que identificaron y postularon la secuencia de alteraciones genómicas involucradas en la ontogenia y progresión del CCR fueron Fearon y Vogelstein en 1990⁵⁷ (Figura 8).

Figura 8. Secuencia de alteraciones genéticas involucradas en el proceso de carcinogénesis del CCR, partiendo de tejido epitelial normal, el desarrollo de los diferentes estadios polipósicos hasta la aparición del adenocarcinoma colorrectal

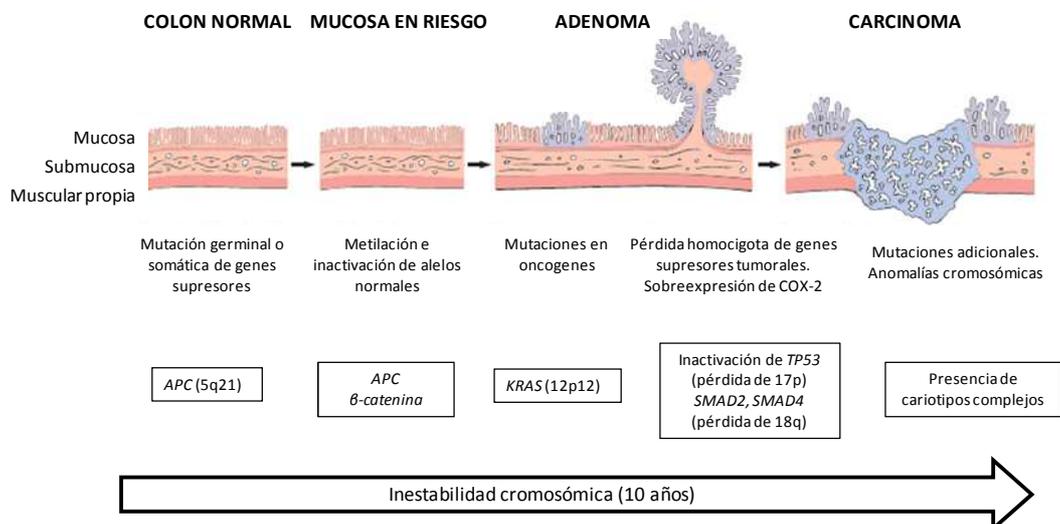


2.2. PATOGÉNESIS DEL CCR

2.2.1. La secuencia adenoma-carcinoma

Como se muestra en las Figuras 8 y 9, el modelo de evolución tumoral clásico del CCR está basado en los perfiles de alteraciones genéticas asociadas a distintos tipos histopatológicos (ej. pólipo adenomatoso, pólipo displásico, adenocarcinoma y adenocarcinoma metastásico), de este modo se infiere que dichos subtipos histopatológicos constituyen diferentes etapas de desarrollo del tumor¹³⁰. De manera normal la proliferación ocurre exclusivamente en la base de la cripta y a medida que las células se mueven hacia la superficie luminal, cesa la proliferación y se diferencian; por otra parte, las células superficiales que recubren la mucosa entérica se pierden hacia la luz intestinal debido a la apoptosis y la exfoliación, y por ello deben ser reemplazadas. En la secuencia adenoma-carcinoma este proceso es interrumpido cuando los mecanismos que regulan la renovación epitelial se alteran debido a mutaciones en los genes *APC* y *KRAS*, así como a las ganancias de los cromosomas 7 y 20q dando lugar a los adenomas, y a medida que estos aumentan de tamaño, se transforman en displásicos y, finalmente, adquieren potencial invasivo, generándose los carcinomas, adquiriendo mutaciones en *TP53* y las alteraciones en el número de copias de múltiples cromosomas (ej. ganancias de 5q, 8q, 13q y pérdidas de 8p, 17p y 18q), que irían siendo adquiridas y acumuladas por la célula tumoral con el paso del tiempo, dotándola de mayor agresividad y capacidad invasiva⁵⁸.

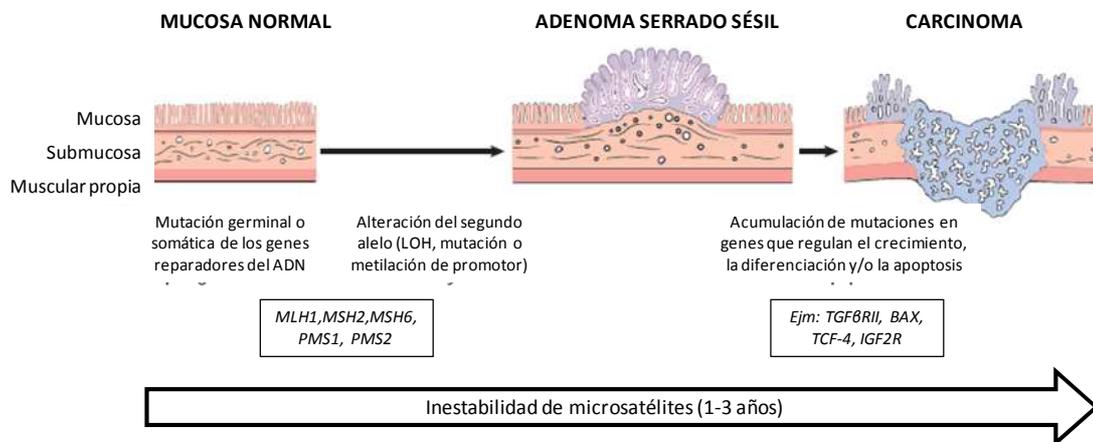
Figura 9. Secuencia adenoma-carcinoma (adaptado de Robbins and Cotran “Pathologic Basis of Disease”¹³¹)



2.2.2. La vía de los adenomas serrados

No obstante, aunque la mayoría de los tumores colorrectales progresan a través de una secuencia de adenoma-carcinoma como acabamos de ver, existe una vía alternativa para la carcinogénesis colorrectal a través de pólipos serrados (Figura 10), un grupo que abarca un espectro morfológico que incluye pólipos hiperplásicos, adenomas serrados y pólipos mixtos.

Figura 10. Desarrollo de los adenomas serrados y carcinomas (adaptado de Robbins and Cotran "Pathologic Basis of Disease"¹³¹)



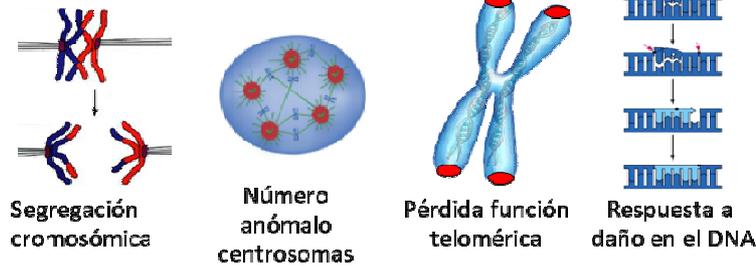
2.3. MODELOS GENÉTICOS DE PROGRESIÓN TUMORAL

La patogénesis del CCR se caracteriza por una acumulación de alteraciones genéticas, que incluye mutaciones que activan oncogenes o inactivan los genes supresores de tumores¹³², o también cambios epigenéticos, siguiendo el patrón de etapas hipotetizado por Fearon y Vogelstein⁵⁷.

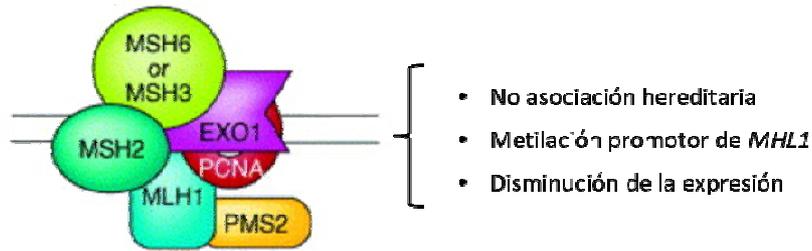
Estas alteraciones genéticas y epigenéticas son responsables de un evento específico dentro de la secuencia que conduce al CCR, contribuyendo a la "iniciación" de la transformación neoplásica del epitelio sano y/o determinando la "progresión" hacia estados más avanzados de la enfermedad. Para acumular las alteraciones genéticas típicas de la mayoría de los CCR, las células tumorales deben adquirir mutaciones y alteraciones epigenéticas a un ritmo mayor en comparación con las células epiteliales normales de la cripta¹³³. En este sentido se han descrito diferentes vías en la carcinogénesis del CCR que se caracterizan por modelos de inestabilidad genética diferentes: i) la mayoría de los CCR siguen la inestabilidad cromosómica (CIN), caracterizado por la pérdida generalizada de heterocigotidad (LOH)¹³⁴ y por grandes anomalías cromosómicas¹³⁵, ii) aproximadamente el 15% de CCR se asocian a una alteración del sistema de reparación del ADN (MMR) lo que conlleva la inestabilidad de microsatélites (MSI); el sistema MMR produce proteínas que reconocen y dirigen la reparación de alteraciones de un solo nucleótido en secuencias de microsatélites que escapan al sistema de corrección de la polimerasa del ADN, iii) una tercera vía para el desarrollo de CCR es el silenciamiento de genes por cambios epigenéticos por la metilación de islas CpG (fenotipo metilador CpG o CIMP), iv) recientemente se han establecido otros sistemas, incluyendo los microARN (miARN) y la inflamación (Figura 11). Las diferentes vías también presentan distintos comportamientos patológicos y manifestaciones clínicas

Figura 11. Principales mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del CCR.

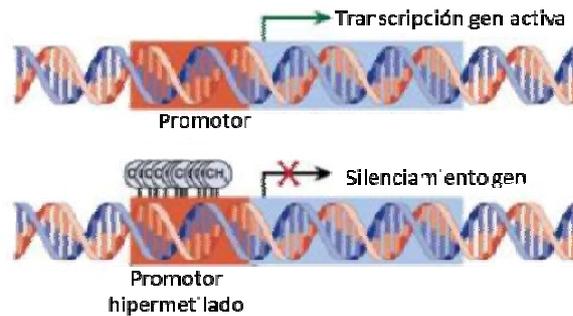
a) Inestabilidad cromosómica (CIN)



b) Inestabilidad de microsatélites (MSI)



c) Fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)



2.3.1. Inestabilidad cromosómica (CIN)

La CIN está presente en el 70-80% de CCRs y se debe a la acumulación de mutaciones que pueden dar lugar a la activación de vías promotoras del crecimiento (oncogenes) o a la disminución de actividad de genes supresores de tumores o vías apoptóticas. La CIN se suele asociar a la adquisición de las alteraciones genéticas siguiendo la secuencia adenoma-carcinoma descrita por Fearon y Volgsetein y es la forma por la que surgen la mayoría de las neoplasias del colon izquierdo¹³⁶. Los tumores asociados a esta vía pueden ser hereditarios (como la poliposis adenomatosa familiar) o esporádicos, y se caracterizan por anomalías cromosómicas que incluyen pérdidas y ganancias en el material genético.

Una de las mutaciones más prevalentes en el CCR¹³⁷ es la mutación en el gen *APC*, presente en el 70-80% de los casos; esta alta incidencia hace que sea considerada la responsable de la transformación maligna de la célula epitelial intestinal, ya que también está presente en el 75% de los adenomas (frecuencia similar a la observada en los adenocarcinomas)¹¹². Las mutaciones del gen *APC* conllevan la activación de la ruta de señalización de WNT/ β -catenina¹²¹, lo que conduce a un aumento en la tasa proliferativa de la célula tumoral, ya que no se produce el efecto inhibitor de la proteína APC, como veremos en secciones posteriores.

De la misma forma, las mutaciones del oncogén *KRAS* constituyen uno de los eventos más tempranos en la ontogenia del CCR, habiéndose detectado incluso en tejido epitelial normal, en ausencia de rasgos histológicos aberrantes^{57,137}. Las mutaciones de *KRAS* se observan en el 20% de los adenomas y en el 40% de los adenocarcinomas colorrectales, siendo más frecuentes las mutaciones que afectan a los codones 12 y 13 del gen^{100,137,138,139}. El oncogén *KRAS* codifica una proteína con actividad GTPasa que pertenece a la familia RAS, involucrada en la vía de señalización MAPK/ERK, que a su vez está implicada en las vías de activación de múltiples funciones celulares entre las que destacan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular, como veremos más adelante^{140,141}. Además, la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* condiciona el tratamiento de pacientes con CCR metastásico, al haberse demostrado la asociación entre la presencia de mutaciones en con la resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR^{90,142,143,144}. Otras alteraciones secundarias en el CCR afectan a los genes pertenecientes a la vía de señalización MAPK/ERK: *BRAF* y *NRAS*, cuyas mutaciones tienen un potente un valor pronóstico, asociándose su presencia con periodos de respuesta al tratamiento y tiempos libres de progresión más cortos¹⁰².

Otras de las alteraciones genéticas tempranas en el CCR esporádico, incluyen las mutaciones del gen *TP53*. Las mutaciones de *TP53* están presentes en el 20% de las fases más avanzadas de adenoma, y también en la gran mayoría (75%) de los adenocarcinomas colorrectales^{57,58}. Desde hace décadas se conoce que *TP53* actúa como gen supresor tumoral, con un papel central en la inducción de apoptosis asociada al daño en el ADN¹⁴⁵. Las alteraciones de este gen, ya sean mutaciones asociadas o no, a deleciones de la región cromosómica 17p13, conllevan la producción de una proteína funcionalmente alterada, lo que favorece la supervivencia y el crecimiento tumoral. A nivel clínico, las alteraciones de

TP53 se asocian a estadios avanzados de la enfermedad, relacionándose con procesos de invasión vascular y linfática en los CCR distales¹⁴⁶.

El gen *DCC* (abreviado del inglés “Deleted in Colorectal Cancer”), localizado en la región cromosómica 18q21, sufre diferentes alteraciones entre las que se incluyen mutaciones puntuales y pérdidas alélicas, que se observan en el 70% de los CCR esporádicos. Estas alteraciones tienen como consecuencia final la disminución de la expresión o la pérdida de funcionalidad del receptor transmembrana *DCC*, lo cual conlleva una pérdida de su capacidad de inducir muerte celular por apoptosis. Además esta alteración en *DCC* se ha visto que está asociada a un peor pronóstico¹⁴⁷.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha identificado otras alteraciones cromosómicas responsables de la ontogenia de la enfermedad. Entre ellas, cabe destacar las ganancias de los cromosomas 7, 8q, 13q, y 20q^{148,149,150,151,152}. Las ganancias del cromosoma 7 tienen especial relevancia clínica ya que en este cromosoma están codificados genes involucrados directamente en la génesis del CCR esporádico como el gen *WNT2* (localizado a nivel de 7q31), cuya sobreexpresión es crucial para la activación de la vía de señalización WNT/ β -catenina. Además, en la región cromosómica 7p12 se encuentra el gen *EGFR*, el cual codifica el receptor de EGFR, proteína que es la diana terapéutica de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR empleados en la actualidad en el tratamiento del CCR metastásico. Por otra parte, las alteraciones numéricas que afectan al cromosoma 8 se caracterizan principalmente por pérdidas del brazo corto y ganancias del brazo largo, donde se localizan varios genes supresores de tumores (*PPP2CB*, *LPL*, *MTUS1*) y el oncogén *CMYC*, cuya sobre-expresión se ha asociado también a un pronóstico adverso¹⁵³. Finalmente, las ganancias de los cromosomas 13q y 20q, constituyen uno de los eventos genéticos más frecuentes, estando presentes en más de la mitad de los CCR esporádicos y detectándose también en adenomas. En estas regiones se ubican genes (*GPC5*, *IGF2*, *AURKA*, *RNPC1*, *ADRM1* y *TCFL*) que se han relacionado directamente con procesos de CIN implicados en la ontogenia y la transformación maligna del CCR¹⁵⁴.

También se deben destacar las alteraciones genéticas implicadas de forma directa en la progresión y aumento de la agresividad del tumor, ya que favorecen su crecimiento y/o capacidad de invasión. Entre ellas, se incluyen alteraciones en los genes de la familia SMAD (*SMAD2*, *SAMD3* y *SMAD4*), integrantes de la vía de señalización TGF- β ,

involucrada en procesos de diferenciación celular y en la progresión metastásica del CCR¹⁵⁵.

Aproximadamente, el 20% de los CCR presentan mutaciones a nivel del gen *PIK3CA*, gen involucrado en la vía de señalización PIK3/AKT efectora de EGFR, asociándose de forma directa con la respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR, aunque en la actualidad la determinación del estado mutacional *PIK3CA* no está incluida en las recomendaciones de las guías oncológicas internacionales como factor pronóstico de respuesta al tratamiento⁹⁰.

Entre otros mecanismos moleculares implicados en la CIN, se han observado niveles aumentados de expresión de quinasas tales como, AURKA y PLK1, particularmente en CCR esporádicos en progresión¹⁵⁶. También la pérdida de la función telomérica constituye otro de los mecanismos causantes de CIN¹⁵⁷. En este contexto, diferentes estudios han demostrado que el acortamiento de los telómeros está directamente relacionado con la ontogenia y la transformación maligna del CCR^{156,157}, al demostrarse un aumento de la actividad telomerasa asociada a la progresión de la enfermedad¹⁵⁷.

2.3.2. Inestabilidad de microsatélites (MSI).

La MSI es una alteración en el ADN de las células por la que el número de repeticiones de los microsatélites (secuencias cortas de bases de nucleótidos que se repiten de docenas a cientos de veces dentro del genoma) está alterado. Esta alteración se encuentra aproximadamente en el 10-15% de CCR esporádicos¹⁵⁸ y en más del 95% de CCR hereditarios no asociados a poliposis, en concreto, en el Síndrome de Lynch.

La causa de la MSI puede ser un defecto o un desajuste de la capacidad de reparar errores en los microsatélites cuando el ADN se copia en la célula. El elemento clave es la disfunción de las proteínas reparadoras del ADN (MMR) debido a mutaciones o alteraciones epigenéticas en los genes que codifican para estas proteínas (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*), de tal modo que las células con capacidad de reparación de ADN deficiente debido a la alteración de los genes MMR acumulan errores de ADN en los microsatélites, que se encuentran distribuidos por todo el genoma. Los microsatélites pueden encontrarse en regiones intrónicas, pero también pueden encontrarse en regiones

codificantes de genes que tienen un papel importante en la regulación del ciclo celular, siendo de especial importancia la inactivación de genes supresores tumorales por la alteración de la secuencia de microsatélites de regiones codificantes, lo que se denomina “hipermutación somática”.

En este sentido, los síndromes de cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (CCHNP o síndrome de Lynch) se caracterizan por presentar una mutación germinal en las proteínas MMR que se hereda de manera autosómica dominante. En el síndrome de Lynch, se desarrolla la inestabilidad de microsatélites en los adenomas convencionales y conduce a la progresión rápida al cáncer. Al tratarse de mutaciones en línea germinal, los pacientes suelen presentar tumores a edades jóvenes (<50 años) tanto en el colon como en otros órganos como por ejemplo el ovario, la vejiga o el endometrio. En el 95% de los casos las mutaciones se encuentran en *MLH1* y *MSH2*¹⁵⁹.

Sin embargo, en la mayoría de los CCR esporádicos con MSI, el defecto en la función de MMR no es una mutación específica en el propio gen, sino que se trata de una hipermetilación de las islas CpG del promotor de los genes que codifican las proteínas MMR (en la mayoría de las ocasiones afectando a *MLH1*), lo que conlleva a un silenciamiento del gen. Estos casos se caracterizan por mostrar frecuentemente metilación bialélica del promotor del gen MHL1 (80% de los casos), tener menor expresión proteica de MLH1 y PSM2, cariotipos diploides (en cerca del 70-75% de los casos), y mutaciones a nivel de gen *BRAF*^{115,160,161}. La mutación activadora V600E del oncogén *BRAF* se encuentra en el 40-50% de CCR esporádicos con MSI, está altamente asociada con la metilación del promotor de *MLH1*, y está ausente en el síndrome de Lynch. La aplicación clínica de este hecho es que si un tumor presenta pérdida de MLH1 mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), se debe realizar estudio mutacional del gen *BRAF*, y si esta resultase positiva, se descartaría la posibilidad de un síndrome de Lynch.

Este tipo de tumores se localizan con mayor frecuencia en el colon derecho, suelen ser adenocarcinomas pobremente diferenciados o medulares y suelen presentar un marcado infiltrado inflamatorio linfocitario peri e intratumoral. Los pacientes con tumores con MSI suelen tener mejor pronóstico que los pacientes con tumores con CIN¹⁶², especialmente en pacientes en los que existe afectación ganglionar y/o tumores en estadio III¹⁶³. La determinación del grado de MSI en el CCR constituye un factor clave a la hora de definir el abordaje terapéutico más adecuado, ya que los casos con MSI elevada son

resistentes a los fármacos citostáticos de la familia del 5-Fluorouracilo (5-FU)¹⁶⁴. Por el contrario, estudios recientes basados en inmunoterapia asocian esta alteración con una respuesta favorable a anticuerpos monoclonales anti-PDL1⁹⁴. La determinación del estado de las proteínas reparadoras del ADN puede realizarse mediante técnicas de IHQ y/o empleando técnicas de biología molecular enfocadas al análisis del estado mutacional de los genes más frecuentemente alterados (*MLH1* y *PSM2*).

2.3.3. Fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)

Una tercera vía por la que puede progresar el CCR es mediante la metilación de islas CpG ("CpG island methylator phenotype" o CIMP)¹⁶⁵. Esta vía consiste en la hipermetilación de secuencias de dinucleótidos CpG localizados en las regiones promotoras de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis, la reparación del ADN, la invasión y la adhesión celular. La hipermetilación de la secuencia CpG del promotor del gen conlleva el silenciamiento e inactivación de genes supresores de tumores tales como *TP16*, *CDHI* y *MLH1*. La metilación generalizada de las islas CpG se conoce como CIMP de alta frecuencia (CIMP-H), y es un mecanismo diferente al silenciamiento por metilación limitado que se produce en la mayoría de los CCRs¹⁶⁶. CIMP-H es un rasgo característico de CCRs que surgen en la vía serrada, y está presente aproximadamente el 20-30% de CCR, incluyendo casi todos los tumores que tienen silenciamiento de *MLH1* por hipermetilación. Las características clínicas de estos tumores son similares a las de los CCR con MSI¹⁶⁷.

La base genética subyacente del fenotipo CIMP-H es poco conocida, pero hay evidencia de que tanto factores genéticos como ambientales (por ejemplo el tabaquismo o la supresión de estrógenos) pueden estar asociados con el desarrollo de carcinomas por la vía serrada. Los factores genéticos y epidemiológicos contribuyen a la metilación de adenomas serrados, lo que predispone al silenciamiento mediante metilación de *MLH1*, del gen de reparación del ADN Methylguanine Methyltransferase (*MGMT*) y de otros genes, lo que conduce a la progresión a adenocarcinoma.

Un hecho que se produce de manera temprana y que se asocia con la progresión de adenoma a carcinoma es el silenciamiento del gen supresor tumoral *p16INK4a*, cuya

pérdida de función provoca la proliferación celular incontrolada, dando lugar a una transformación neoplásica.¹⁶⁸

2.3.4. Vía inflamatoria

La inflamación crónica es hecho crítico para la iniciación y la progresión del CCR. Esto es respaldado por el hallazgo de fuertes asociaciones entre la EII y el CCR, y por los hallazgos que apoyan los efectos positivos del uso crónico de AINEs en el CCR. Existen múltiples mediadores de la inflamación que predisponen a un individuo a desarrollar un carcinoma. Los posibles mecanismos implicados son el mantenimiento del crecimiento celular a través de la promoción del sistema antiapoptótico y el aumento del daño al ADN mediante la activación de las especies mutagénicas reactivas de oxígeno y nitrógeno. Otros mecanismos pueden ser la producción de factores de crecimiento angiogénicos y linfangiogénicos, y los cambios de los sistemas de membrana para facilitar la invasión y la alteración de la adhesión celular^{169,170}.

2.4. VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN EL CCR

2.4.1. Vía de señalización WNT/ β -catenina

Una mutación inicial clave en el desarrollo del CCR es la mutación del gen supresor tumoral APC, involucrado tanto en casos esporádicos de inestabilidad cromosómica como en poliposis adenomatosa familiar (FAP) por la mutación de la línea germinal¹⁷¹. En el síndrome FAP se ha identificado una mutación germinal del gen APC en el 60-80% de las familias¹¹⁹. En el 70-80% de los CRC esporádicos se encuentran mutaciones en APC, que ocurren de manera temprana durante el desarrollo neoplásico¹⁷¹. Puesto que parece que la inactivación del gen APC es necesaria para el desarrollo de adenomas, este ha sido denominado como gen "gatekeeper" de la neoplasia colorrectal¹⁷². El gen APC es un gen supresor de tumores implicado en la vía de señalización APC/ β -catenina/Tcf (vía WNT), relacionada con el desarrollo embrionario y la renovación epitelial intestinal.

La vía de señalización de WNT/ β -catenina constituye una vía clave durante el desarrollo embrionario al estar involucrada en procesos de morfogénesis y diferenciación celular, encaminados a la generación de los diferentes órganos; en el intestino, su principal función es la renovación del tejido epitelial. La importancia clínica de esta vía ha sido demostrada por mutaciones que conducen a gran variedad de enfermedades, incluyendo CCR. En este sentido, la vía de señalización de WNT/ β -catenina se encuentra alterada en la gran mayoría de los tumores colorrectales (93% de los casos), siendo las alteraciones más frecuentes las mutaciones en los genes APC y CTNNB1, presentes en el 75% y 15% de los casos, respectivamente. Ambas mutaciones son mutuamente excluyentes y se asocian a tumores con características biológicas diferentes; así, mientras que las mutaciones en CTNNB1 (β -catenina) son más frecuentes en adenomas pequeños con poder invasivo limitado, las mutaciones en el gen APC se asocian a tumores invasivos de mayor tamaño. Los ligandos de WNT se unen a los receptores de la familia de proteínas Frizzled y a sus co-receptores dando lugar a la inactivación de un complejo citoplasmático de proteínas que incluye las proteínas APC y axina, que promueven la degradación de β -catenina en el proteosoma. La inactivación de APC se traduce en un aumento de la señal de la vía WNT, por la falta de degradación β -catenina. La acumulación citoplasmática de β -catenina conduce a su traslocación al núcleo, donde se une a Tcf y forma un complejo de

activación de la transcripción, que promueve la transcripción, entre otros genes, de MYC y CCND1 (ciclina D1). La activación excesiva de ciclina D1 por mutación de APC contribuye al desarrollo de neoplasias en el colon al permitir que la célula escape de la apoptosis¹⁷³. Las mutaciones en APC tienen como consecuencia la alteración de la proliferación, diferenciación, migración y adhesión de las células mutadas¹⁷¹.

La importancia clínica de esta vía ha sido demostrada por mutaciones que conducen a gran variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer de mama y próstata, glioblastoma, diabetes mellitus tipo 2, entre otras, por la falta de degradación de β -catenina.²⁷

También pueden encontrarse mutaciones en los genes implicados en la vía APC/ β -catenina/Tcf en tumores esporádicos con inestabilidad cromosómica que carecen de mutaciones en APC130. En el 48% de tumores sin mutaciones en APC se observan mutaciones en el gen de la β -catenina (CTNNB1) que conllevan a su activación constitutiva, lo que indica que en las primeras etapas de la patogénesis del CCR están presentes las mutaciones en CTNNB1 y que posiblemente sustituyen a las mutaciones APC en las etapas de iniciación tumoral¹⁷⁴. La actividad de β -catenina también puede incrementarse por alteraciones en oncogenes que regulan su actividad, como es la amplificación del gen de la ciclina dependiente de quinasa 8 (CDK8)¹⁷⁵. β -catenina también puede interactuar con diferentes miembros de la vía Notch, reguladores de la diferenciación celular. Las alteraciones de la vía Notch, así como la activación de Tcf, o la alteración de otros genes reguladores de APC como BubR1¹⁷⁶, están relacionadas con el proceso de la carcinogénesis en el CCR^{176,177}.

2.4.2. Vía de señalización de PIK3/AKT.

Las alteraciones de la vía de PIK3/AKT suelen ocurrir de manera simultánea con mutaciones de APC¹⁷⁸. Se ha visto que la presencia simultánea de mutaciones en APC y PIK3CA en modelos animales están asociados con un número elevado de tumores, mayor tamaño de los mismos, y un comportamiento más agresivo¹⁷⁸.

PIK3CA es un heterodímero compuesto por una unidad catalítica y una subunidad reguladora. Su activación, se inicia mediante señales extracelulares, especialmente por

señales mediadas por los factores de crecimiento del tipo insulina (IGF1 y IGF2), que fosforilan/activan PIK3. PIK3CA desencadena la activación de diferentes factores de transcripción nuclear a través de una cascada de quinasas, entre otros, activa a AKT, el cual puede activar CREB, inhibir p27 y activar mTOR, un regulador central del crecimiento y del metabolismo, cuya acción se traduce en un aumento de la supervivencia y de la proliferación celular. La actividad de PIK3CA está regulada por *PTEN*, cuya actividad fosfatasa hace que actúe como inhibidor natural de PIK3, favoreciendo la apoptosis. En el CCR, se han descrito diferentes mutaciones activadoras en el gen *PIK3CA* (9% de los casos) y/o deleciones en *PTEN* (10%) que activan la vía efectora de PIK3/AKT, estimulando la proliferación y el crecimiento celular^{125,179,180}, como se puede observar en la Figura 12. Desde el punto de vista clínico, las anomalías genéticas en estos dos genes y en los genes involucrados en esta vía se han relacionado con una SG más corta entre los pacientes con CCR esporádico¹⁸¹. Así mismo, las mutaciones del gen *PIK3CA* influyen en la respuesta a Cetuximab y Panitumumab, siendo los pacientes con fenotipo WT aquellos que presentan respuestas más favorables^{179,182}.

Se ha visto que el uso prolongado de la aspirina aumenta la supervivencia en pacientes con CCR y con mutaciones en *PIK3CA*. Esto puede ser debido a una inducción de la apoptosis por la inhibición de PIK3CA. La activación de PIK3CA aumenta la actividad de COX2 y la síntesis de prostaglandinas, lo que inhibe la apoptosis en las células tumorales. La aspirina inhibe COX2, lo que inactiva la señalización de PIK3CA, favoreciendo la inducción de la apoptosis¹⁸³. Estos hallazgos sugieren que el estudio mutacional de *PIK3CA* pueda ser utilizado como un biomarcador predictivo para el tratamiento adyuvante del CCR con aspirina^{183,184}.

2.4.3.Vía de señalización de MAPK/ERK

La vía de señalización MAPK/ERK está integrada por diversas proteínas con actividad quinasa, entre las que se incluyen las proteínas de la familia RAS, activadas habitualmente por señales extracelulares y encargadas de iniciar una cascada de activación (mediante fosforilaciones) de las quinasas de la familia RAF, que concluye con la activación secuencial de las proteínas MAPK (factores nucleares de transcripción que promueven la progresión del ciclo celular y la división celular). (Figura 12). En esta

secuencia, la proteína KRAS activa a quinasas RAF (CRAF1, ARAF y BRAF) con la posterior activación secuencial de MEK1/2 (MAPKK) y de las MAPKs efectoras finales ERK1 y ERK2. La vía de RAS promueve la progresión del ciclo celular mediante la inducción de ciclina D1 (CCND1) y favorece la supervivencia de células tumorales inhibiendo proteínas proapoptóticas e induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas (BCL2, BCL-XL y MCL-1). Además, esta vía contribuye a la evasión de mecanismos de senescencia mediante la activación de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT), lo cual antagoniza el acortamiento de los telómeros y contrarresta los efectos de la detención del ciclo celular o la muerte celular en respuesta al daño del ADN mediado por p53 y p21.

La activación de forma constitutiva de esta vía de señalización, debido a mutaciones en los genes *KRAS* y *BRAF*, conlleva un aumento de la proliferación celular. Desde el punto de vista clínico, las alteraciones genéticas que afectan a los genes que codifican para proteínas de esta vía de señalización se han asociado tanto con el pronóstico como con la respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR^{142,143}. Así, la mutación más frecuentemente detectada del gen *BRAF* (BRAF V600E) se ha asociado con un pronóstico adverso en pacientes con CCR, debido a una mayor resistencia al tratamiento^{100,102}.

Las mutaciones activadoras en *KRAS* están presentes en aproximadamente el 40% de los CCR y fueron una de las primeras alteraciones genéticas descritas¹⁸⁵. Las mutaciones de *KRAS* típicamente ocurren de manera temprana, pudiéndose detectar en los focos de criptas aberrantes o en adenomas pequeños y tienen como consecuencia la activación constitutiva del gen, lo que permite a la célula evadir la apoptosis y adquirir una ventaja en el crecimiento. Más del 90% de las mutaciones en el gen *KRAS* ocurren en el codón 12 y en el codón 13¹⁸⁶. Las mutaciones en el codón 12 confieren un fenotipo más oncogénico que las mutaciones en el codón 13, lo que sugiere que las mutaciones del codón 13 están más implicadas en la transición adenoma-carcinoma; mientras que las mutaciones en el codón 12 favorecen la invasión local y la diseminación tumoral a distancia¹⁸⁷.

2.4.4.Vía de señalización de TP53.

TP53 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), es uno de los genes supresores tumorales más estudiados y su papel es fundamental en la regulación del ciclo celular, reparación del daño del ADN, regulación de la senescencia celular y regulación de la apoptosis^{188,189}. La vía de *TP53* se encuentra alterada en más de la mitad de los pacientes con CCR (50%-70% de los carcinomas). Así, se considera que la pérdida de función de *TP53* constituye uno de los eventos iniciales más habituales, a menudo en el punto de desarrollo de la displasia de alto grado¹³⁷ (4-25%) o bien en las últimas etapas de la tumorigénesis¹⁹⁰. En estadios avanzados de la enfermedad, se ha descrito la presencia de pérdidas de este gen en tres cuartas partes de los CCR, de los que solamente la mitad presenta el otro alelo mutado, con la consiguiente pérdida de función de la proteína; en la otra mitad de los pacientes, *TP53* mantendría intacta su función^{191,192}. Las alteraciones de *TP53* conllevan una inhibición de la apoptosis y un aumento de la supervivencia, y con ello, una proliferación celular descontrolada.

2.4.5.Vía de señalización de TGF-β.

La proteína TGF-β pertenece a una familia de citoquinas anti-inflamatorias involucradas en la proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular. Habitualmente, el epitelio intestinal normal muestra expresión de TGF-β, que actúa como inhibidor del ciclo celular, jugando un papel esencial en la formación del tejido y el mantenimiento de su homeostasis fisiológica. Sobre esta vía se ha descrito que se encuentra alterada en más de la mitad (57%) de los CCR, habiéndose identificado diferentes alteraciones en los distintos componentes de la cascada de señalización activada por TGF-β, involucrados en el CCR en procesos de carcinogénesis, angiogénesis, metástasis e inmunosupresión¹⁹³. La activación de la vía de señalización de TGF-β comienza habitualmente con la unión de TGF-β a su receptor de membrana, lo cual activa una cascada de fosforilaciones que tienen como resultado final la formación de un complejo integrado por diversas proteínas de la familia SMAD: Smad2, Smad3 y Smad4. Este complejo se dirige al núcleo donde regula la transcripción de diferentes genes diana como *CDKN1A*, *CDKN1B* o *CDKN2B*, cuya función es la detención del ciclo celular¹⁹³. Las mutaciones y/o deleciones en *SMAD2* y *SMAD4*, están directamente relacionadas con

la ontogenia del tumor, constituyendo la pérdida de 18q uno de los eventos iniciales involucrados en la transición de adenoma a adenocarcinoma de colon¹⁵⁵. Todas estas alteraciones en los componentes de esta cascada de señalización bloquean la vía TGF- β , actuando como promotores del desarrollo tumoral¹⁹⁴. Recientemente, algunos estudios han demostrado la existencia de una estrecha relación entre esta la vía de señalización de TGF- β y un mayor grado de progresión tumoral, invasión y metástasis¹⁹⁵, en las que estarían implicados diferentes mecanismos. En este sentido, cabe señalar que varios estudios refieren su implicación en el proceso de transición epitelio-mesenquima (EMT) al inducir expresión de Snail, Slug y Twist^{196,197}.

2.4.6.Vía de señalización de Notch.

Las proteínas involucradas en la vía de señalización de Notch se expresan de forma habitual en las células de la zona basal de las criptas intestinales, siendo esenciales para una correcta maduración del epitelio intestinal. En términos generales, son proteínas que están involucradas en la regulación de las células progenitoras y en el proceso de diferenciación celular, sobre todo en las células caliciformes¹⁹⁸.

En esta vía a menudo es activada a través de la vía de EGFR y en ella las proteínas ligando (Delta-like y Jagged) se unen a la porción extracelular de las proteínas transmembranas Notch (Notch1-4) induciendo su rotura proteolítica con la liberación posterior de su porción intracelular (NICD); este fragmento intracelular se trasloca al núcleo donde induce la expresión de reguladores transcripcionales de la familia HES, que dirigen la proliferación celular durante la embriogénesis. Además también modulan la actividad de algunos genes reguladores del ciclo celular, y de HER2, y promueven la activación de las vías de señalización de NF- κ B y PI3K. La inactivación de esta vía en las células progenitoras conlleva una diferenciación acelerada y prematura¹⁹⁹.

En el CCR, la vía de señalización Notch podría estar implicada en los estadios iniciales de la enfermedad y concretamente, en la transición de tejido intestinal normal a adenoma, encontrándose alterada en el 75% de los casos¹⁹⁹. No obstante, hoy se reconoce que esta vía no solo participaría en el proceso de carcinogénesis, sino que podría jugar también un papel importante en la progresión del tumor, interviniendo en el proceso de invasión tisular al favorecer el cambio fenotípico que sufren las células tumorales en la

EMT, reflejado en un aumento de la expresión de proteínas involucradas en el proceso EMT como CD44, Slug y Smad3 en tumores que asocian alteraciones en la vía de activación de Notch1²⁰⁰.

2.4.7.Vía de señalización Hedgehog.

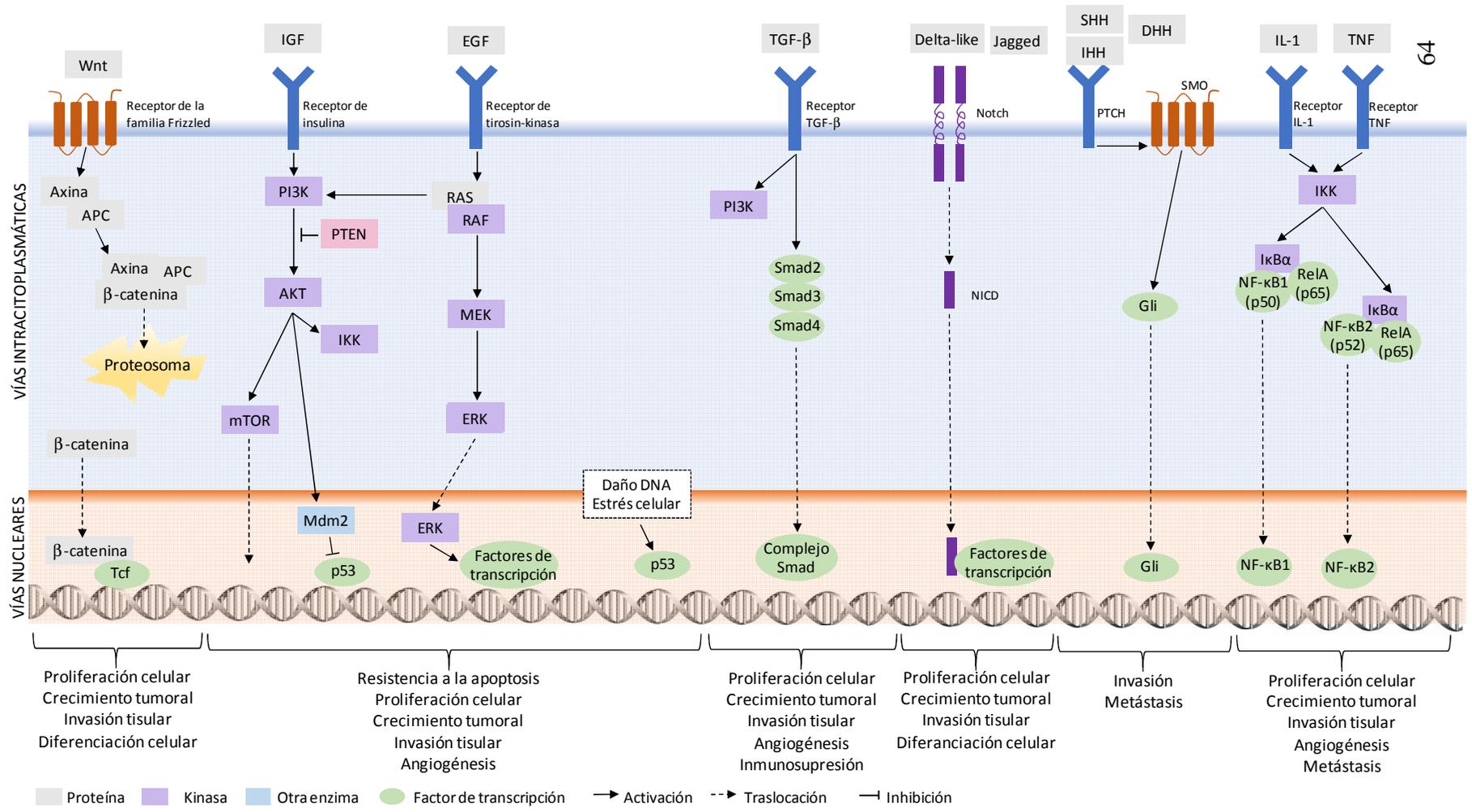
Aunque la vía de señalización de Hedgehog (Hh) se descubrió y estudió primeramente debido al importante papel que desempeña durante el desarrollo embrionario, más recientemente se ha puesto de manifiesto su implicación en una gran variedad de tumores y en el mantenimiento de las células madre de algunos tejidos^{201,202}. La vía de señalización Hh es compleja y se han identificado tres genes Hedgehog (sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) y desert Hedgehog (DHH)), dos genes Patched (PTCH1 y PTCH2) y 3 genes GLI (GLI1, GLI2 y GLI3). Normalmente, la vía de señalización de Hh está regulada negativamente por el gen supresor de tumores *PTCH1* que inactiva la proteína de la familia Frizzled, Smoothed (SMO). Cuando los ligandos de Hh (entre ellos SHH) se unen a PTCH1, contrarrestan la inhibición de SMO e inician una cascada de señales que resulta en la activación de los factores de transcripción GLI (GLI1 y GLI2), que promueven la transcripción de genes implicados en el crecimiento y proliferación celular, angiogénesis, remodelamiento de la matriz extracelular y la homeostasis celular, tales como *NMYC* y *BCL2*, las proteínas WNT²⁰³ o los factores de transcripción de la familia de Forkhead²⁰⁴. Por lo tanto, esta ruta es fundamental en la regulación, crecimiento y organización de los patrones histológicos de diferentes órganos, particularmente de los gastrointestinales.

En el CCR se ha observado que la sobre-activación de esta vía de señalización en células progenitoras tumorales confiere un fenotipo más proliferativo asociado a un mayor crecimiento tumoral, a la vez que una mayor capacidad invasiva²⁰⁵. Así, a modo de ejemplo, varios estudios han puesto de manifiesto que existe un aumento gradual de la expresión de las proteínas Smo y Gli1 por IHQ en la transición adenoma-adenocarcinoma²⁰², y han correlacionado la sobre-expresión de Gli1 con la presencia de invasión linfática del tumor y con la progresión de la enfermedad²⁰⁶.

2.4.8.Vía de señalización de NF-κB/IKK.

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. NF-κB se encuentra en la mayoría de tipos de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, las citoquinas, radiación ultravioleta, LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales²⁰⁷. El NF-κB juega un papel clave en la regulación del sistema inmune, concretamente de la inmunidad innata, y la respuesta inflamatoria asociada a la misma²⁰⁸. En este sentido, se ha descrito que los pacientes con EII tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR, constituyendo estos casos aquellos en los que la activación de esta vía de señalización tendría mayor relevancia en el desarrollo del tumor²⁰⁸. La activación de NF-κB -RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) y p52/p100 (NF-κB2) habitualmente está asociada a fosforilación de la proteína quinasa IKK, y mediante este mecanismo, la se produce la ubiquitinación y degradación del inhibidor de NF-κB Iκβ, en el citoplasma; como consecuencia, se libera el dímero p50/p65 que se trasloca al núcleo donde activa la transcripción de genes diana. Así, se cree que la activación constitutiva de NF-κB/IKK iniciada por citocinas pro-inflamatorias como TNF-α o IL-1, podría provocar un incremento en la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular (*CCND1*, *CMYC*), genes con actividad anti-apoptótica de la familia de *BCL2* y genes involucrados en la amplificación de la respuesta inflamatoria (*COX-2*)²⁰⁸. Además de haberse relacionado con la ontogenia tumoral, esta vía de señalización se ha involucrado también en la progresión del CCR, al asociarse con una mayor actividad angiogénica cuando se detectan niveles elevados de NF-κB. En la actualidad, se desarrolla una búsqueda de fármacos que actúen sobre moléculas de NF-κB, no sólo para el manejo de enfermedades inflamatorias sino también para el uso durante el tratamiento de tumores colorrectales resistentes a radio y quimioterapia^{209,210}.

Figura 12: Representación esquemática de las principales vías de señalización intracelular involucradas en el desarrollo, mantenimiento y progresión del CCR esporádico.



En condiciones fisiológicas, todas las vías de señalización anteriormente descritas interaccionan entre sí con el fin de regular procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, y mantener una homeostasis funcional equilibrada a nivel del epitelio intestinal. La presencia de alteraciones en alguna de ellas, conlleva una desregulación de las interacciones normales y la afectación de alguna de estas funciones celulares, incluyendo el incremento descontrolado de las células tumorales, asociado a alteraciones en la diferenciación celular y tisular y la creación de un microambiente (ej. respuesta inmune) que promueve, no solo el mantenimiento y expansión del tumor, sino también su capacidad de invasión local y de diseminarse a distancia¹⁶⁹.

2.5. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS DEL CCR.

2.5.1. Implicaciones de las vías de progresión para la detección y prevención del CCR.

La colonoscopia de cribado es más eficaz para la prevención de la CCR izquierdo que derecho, y se cree que esta diferencia se debe al predominio de la progresión del adenoma-carcinoma por la vía convencional en el colon izquierdo, comparada con la vía de progresión del adenoma-carcinoma serrado en el colon derecho. El fracaso de la detección y prevención del cáncer de colon derecho parece estar relacionado con las dificultades que existen en la identificación endoscópica de las lesiones serradas así como por sus características moleculares²¹¹. Los pólipos serrados son más difíciles de extirpar completamente, y también tiene un mayor riesgo de progresión por la adquisición de alteraciones en la reparación del ADN e inestabilidad de microsatélites.

2.5.2. Marcadores pronósticos genéticos.

2.5.2.1. Estudio de proteínas reparadoras del ADN (MMR)

De las alteraciones moleculares estudiadas, la que ha surgido como marcador pronóstico de mayor utilidad es la presencia de MSI y la pérdida de función de MMR, ya que se puede determinar de manera sencilla y con un bajo coste, mediante técnicas de IHQ. Múltiples estudios han puesto de manifiesto que la deficiencia de MMR es un marcador predictivo de un buen pronóstico, independientemente de otras variables²¹², y esto puede ser debido a que los tumores con MSI presentan mayor respuesta linfocitaria peritumoral. Esto tiene relevancia para la enfermedad en estadio II ya que se ha visto que la quimioterapia adyuvante basada en 5-FU no es efectiva en estos pacientes²¹³. Dado el pronóstico favorable y la falta de beneficio de la quimioterapia adyuvante basada en 5-FU, muchos autores sugieren que los pacientes con cáncer colorrectal en estadio II con un fenotipo MSI-H no deben ser tratados con quimioterapia adyuvante¹⁰³. Las guías de manejo clínico actuales incluyen la incorporación del estado MMR junto con otros factores

clínicos y patológicos para identificar subgrupos de pacientes que no obtendrán beneficios potenciales de la quimioterapia adyuvante⁸⁴.

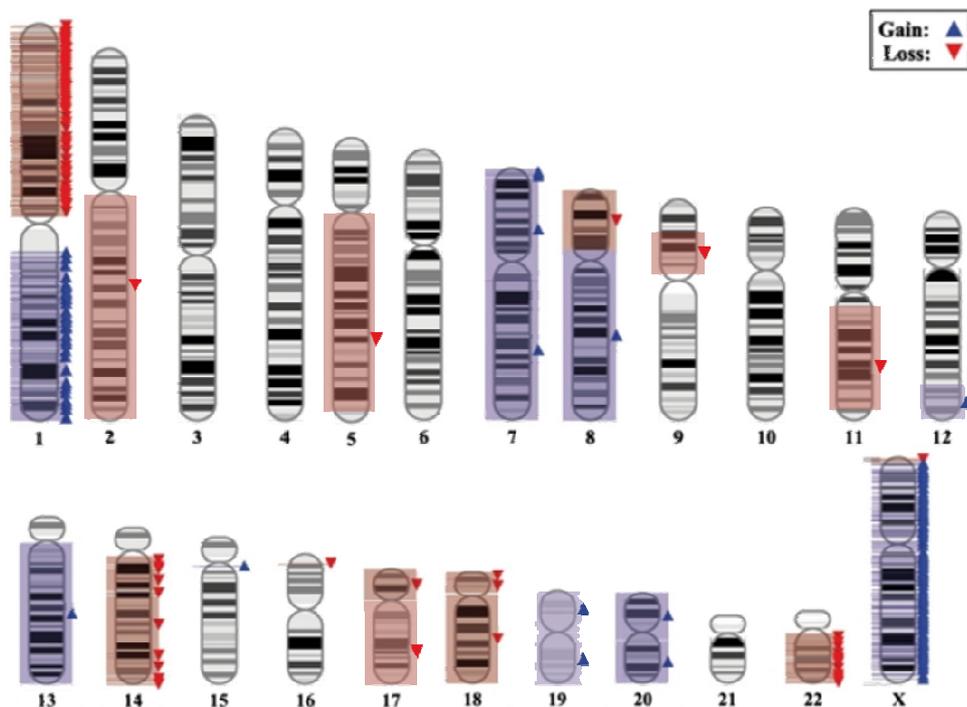
2.5.2.2. *Alteraciones genéticas con implicación pronóstica*

A pesar de los grandes progresos que se han obtenido en la identificación de las alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo del CCR, las alteraciones genéticas generadoras de fenotipos celulares más agresivos en las etapas más avanzadas de la enfermedad, son mucho más desconocidas. Con el fin de avanzar en el conocimiento de las alteraciones genéticas involucradas la progresión de la enfermedad se han llevado a cabo diferentes estudios genéticos, utilizando una gran diversidad de técnicas, desde la citogenética convencional (CC) hasta las técnicas de secuenciación masiva o arrays de alta densidad, en las que se han analizado de forma simultánea los tumores primarios y las metástasis del mismo paciente^{214,215,216,217,218}. Estos resultados han mostrado la existencia de cariotipos complejos presentes ya en los tumores primarios, asociados a fenotipos celulares más agresivos, donde al menos se detectan alteraciones en 7 regiones cromosómicas ya sean numéricas o estructurales, además, de la presencia de más de un clon tumoral en la mayoría de los tumores metastásicos analizados^{214,215,216,217,218}. Además, estos estudios han permitido identificar tanto las alteraciones presentes en el clon tumoral que comparten el tumor primario con las metástasis hepáticas, como las nuevas alteraciones (adquiridas) en las muestras metastásicas, probablemente como consecuencia a la adaptación al nuevo microambiente tumoral que la célula neoplásica coloniza el hígado^{219,220,221}.

Mediante el análisis del número de copias cromosómicas (Figura 13) con técnicas de hibridación *in situ* fluorescente sobre núcleos interfásicos (*i*FISH) se han observado deleciones de los brazos cromosómicos 17p y 18q, así como ganancias del cromosoma 7 o de las regiones cromosómicas 8q, 13q y 20q; todas ellas alteraciones presentes de forma sistemática (80% de los casos) tanto en tumores primarios como en las correspondientes muestras metastásicas²¹⁹. Mientras que la ganancia de 1q y pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 9p, 11q, 17q²¹⁹ se detectan de forma preferente en las muestras metastásicas. Estos hallazgos se han confirmado mediante técnicas de alta densidad, así, con arrays de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) han sido identificadas alteraciones cromosómicas adquiridas en las metástasis, no presentes en tumores primarios

(deleciones del cromosoma 4 y de 10q, así como ganancias en 5p y 6p²²²). Cabe señalar que en todas estas regiones cromosómicas se ubican genes involucrados en procesos de proteólisis (*MMP2*), adhesión (*CEACAM7*), angiogénesis (*ANGPT2*), diseminación (*ID1* y *BCL2L1*) y crecimiento celular (*ERBB2*) así como otros genes asociados a la adaptación celular al microambiente hepático²²³. En esta misma línea, se han estudiado las alteraciones genómicas en las diferentes formas metastásicas; así, en las metástasis ganglionares se han encontrado con mayor frecuencia pérdidas de los cromosomas 18q y 21q en comparación con los tumores primarios, mientras que en las metástasis hepáticas, se observó un número aún mayor de alteraciones, caracterizadas por deleciones en los brazos cromosómicos 2q, 5q, 8p, 9p, 10q, 11p y 21q y ganancias de las regiones cromosómicas 1q, 11q, 12qter, 17q12-21, 19 y 22q en comparación con sus tumores primarios. Estos hallazgos sugieren que la diseminación tumoral linfática y hematogena representa vías independientes en el proceso de invasión tumoral²²⁴.

Figura 13. Representación esquemática de un cariotipo de un tumor metastásico sincrónico de un CCR indicando las alteraciones cromosómicas más frecuentes (rojo, pérdidas y azul, ganancias) (adaptado de Sayagués et al.²²⁵).



Dentro de las primeras investigaciones relacionadas con la identificación de las alteraciones genéticas involucradas en el proceso metastásico del CCR se encuentra el estudio del estado mutacional del gen *KRAS* en muestras pareadas de tumor primario y metástasis, no solo por la importancia que tiene en el abordaje terapéutico de estos pacientes sino también por la implicación en el proceso de carcinogénesis. Diferentes estudios evidenciaron la gran concordancia entre el estado mutacional de *KRAS* entre los tumores primarios y las metástasis pareadas corroborando la presencia de esta alteración genética como uno de los eventos primarios que desencadenan la enfermedad^{226,227}. También se han realizado estudios comparativos entre CCR primarios y sus metástasis sincrónicas, evaluando la correlación existente en el estado mutacional de genes seleccionados tanto por su importancia a nivel biológico del tumor como del abordaje clínico de los pacientes (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* y *TP53*) concluyendo que existe una gran concordancia entre las mutaciones de los genes *RAS* y *PIK3CA* entre el tumor primario y la metástasis, mientras que las mutaciones de *TP53* son más frecuentes en las muestras metastásicas²²⁸. En contraposición a estos resultados, diversos autores han encontrado discrepancias en el estado mutacional de estos genes entre tumores primarios y sus correspondientes metástasis, observándose una gran concordancia del estado mutacional del gen *KRAS* entre tumores primarios y sus metástasis y no en otros genes analizados (*NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*)²²⁹. Estas discrepancias no solo se han detectado entre los tumores primarios y las metástasis hepáticas, sino que también se han visto en muestras de ganglios regionales metastásicos²³⁰.

Con las nuevas técnicas de secuenciación masiva se ha corroborado en muestras pareadas tumor primario y metástasis la elevada concordancia del estado mutacional de la mayoría de los genes analizados, detectando resultados discordantes en las mutaciones en los genes *TP53*, *SMAD4* y *PTEN*, lo que subraya la importancia tanto de estos genes y de las vías de señalización que controlan en el proceso metastásico^{227,228}.

A nivel genómico también se han descrito las alteraciones detectadas en los niveles de expresión de los genes involucrados en procesos de angiogénesis, adhesión y migración celular, empleando microarrays de alta densidad. Por ejemplo, se ha observado una relación directa entre los elevados niveles del CEA y genes involucrados en los procesos de adhesión, o angiogénesis, con fenotipos metastásicos (Tabla 6)²³¹. Recientemente, otros estudios han puesto de manifiesto anomalías en los niveles de expresión génica mediante arrays de alta densidad, permitiendo identificar no solo

diferencias en la expresión entre el tejido intestinal normal y los tumores primarios, sino también diferencias en los niveles de expresión génica entre las metástasis hepáticas y sus correspondientes tumores primarios, emergiendo la vía de señalización TFG- β como una de las vías candidatas a desempeñar un papel importante en el proceso metastásico de la enfermedad²²⁰.

Tabla 6 Genes con alteraciones en sus niveles de expresión implicados en el proceso metastásico (adaptado de Katayama et al.²³¹)

EXPRESIÓN	GEN ALTERADO	CARACTERISTICAS DEL GEN	PROCESO AFECTADO
▲	<i>MMP-7</i>	Matriz metaloproteasa. Matrilisina	Proteólisis
▲	<i>MMP-2,-9</i>	Matriz metaloproteasa. Gelatinasa	
▼	<i>MMP-1, -8, -13</i>	Matriz metaloproteasa. Colagenasa	
▲	<i>TIMP-1</i>	Inhibidor MMP	
▲	<i>uPAR</i>	Activación del sistema plasmin-plasminógeno	
▲	<i>ICAM-1</i>	Superfamilia de las inmunoglobulinas	Adhesión celular
▲	<i>VCAM-1</i>	Superfamilia de las inmunoglobulinas	
▲	<i>E-CADHERIN</i>	Cadherina	
▼	<i>CD44</i>	Receptor ácido hialurónico	
▲	<i>CEA</i>	Molécula adhesión. Glicoproteína	Angiogénesis
▲	<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento	
▲	<i>PD-ECGF</i>	Factor de crecimiento	
▲	<i>TRIAL-R</i>	Recepto de membrana	Supervivencia
▲	<i>CXCR4</i>	Receptor de membrana para citosina	Migración

▼ infra-expresión, ▲ sobre-expresión

2.5.3. Implicaciones clínicas de la heterogeneidad genética a del CCR a nivel intra-tumoral

Hoy se conoce que el CCR es una enfermedad compleja en la que se incluye un grupo amplio de tumores, muy heterogéneo desde el punto de vista biológico y clínico, e incluso con una variabilidad en la tanto en la supervivencia como en la respuesta a los distintos tratamientos administrados, incluso entre casos que comparten características histopatológicas similares^{232,233}. Los análisis genéticos han mostrado además que los

tumores de distintos pacientes presentan también perfiles genómicos diferentes y con combinaciones de alteraciones genéticas muy variables que podrían en gran medida, ser las responsables de explicar la heterogeneidad clínico-biológica observada^{234,235,236}. En este contexto, hay que tener en cuenta además la existencia de heterogeneidad celular dentro de un mismo tumor, donde con mucha frecuencia coexisten diferentes clones de células tumorales^{219, 237}..

Los trabajos iniciales a este respecto estaban dirigidos a la caracterización de clones portadores de distintas alteraciones cromosómicas, identificados mediante CC. Así, en los primeros trabajos realizados, al analizar lesiones epiteliales malignas mediante CC, se evidenció la coexistencia de distintos subclones de células tumorales, siendo cada uno de ellos portador de diferentes alteraciones cromosómicas²³⁸. Esta heterogeneidad genética frecuentemente se traduce en heterogeneidad morfológica, lo cual obliga a que los estudios en los que se basa el diagnóstico y clasificación histopatológica del tumor tengan obligatoriamente que realizarse sobre diferentes secciones del tumor para poder así establecer de forma más precisa el grado histológico más prevalente dentro del mismo^{238,237}.

Posteriormente, el estudio de la heterogeneidad genética del CCR a nivel intratumoral, se centró en el análisis y comparación de los perfiles citogenéticos²¹⁹ y moleculares en distintas regiones del tumor. Con estos estudios se concluye que en cada CCR existen: i) alteraciones cromosómicas primarias como aquellas alteraciones presentes en todas de las células neoplásicas de un mismo tumor y que posiblemente están relacionadas con los eventos iniciadores de la carcinogénesis y ii) aquellas alteraciones genéticas que se detectan en una proporción de las células neoplásicas del tumor que serían fruto de la inestabilidad cromosómica en las células tumorales a nivel local, y base de la generación de heterogeneidad genética a nivel intratumoral. También se han investigado las posibles diferencias entre distintas zonas de un mismo tumor analizando la variabilidad genética y genómica existente entre las células del CCR localizadas en la zona periférica del tumor y aquellas ubicadas en la zona central del mismo, a nivel de célula individual, constatándose que los CCR presentan una gran heterogeneidad a nivel intratumoral con distintos perfiles de expresión en las diferentes regiones analizadas²³⁹. Así se ha observado que, mientras que en las regiones periféricas las células expresaban genes relacionados con la división, la adherencia y la migración celular como parte de la adaptación del tumor al

microambiente tumoral, las células de la zona central del tumor expresaban un perfil de genes implicados en la regulación de la proliferación celular.

Los estudios más recientes en los que se analiza la heterogeneidad genética del CCR a nivel intratumoral, se han centrado en establecer la posible relación clonal existente entre las distintas lesiones neoplásicas presentes en el tejido tumoral de cada paciente. En este sentido, diferentes estudios han sugerido que determinados perfiles genéticos compartidos por los clones de células tumorales presentes en el tumor primario de pacientes con CCR y en sus correspondientes metástasis, facilitaría el desarrollo de un fenotipo invasivo y un comportamiento clínico más agresivo^{240,241}. Nuestro grupo de investigación, empleando técnicas de FISH, ha podido establecer la existencia de una relación directa entre la presencia de clones tumorales con cariotipos complejos en el tumor primario y la existencia de metástasis hepáticas sincrónicas. En este estudio, se constata la presencia de clones de células tumorales con perfiles genéticos superponibles a los del propio tumor primario, asociadas a la aparición de nuevas alteraciones genéticas características de fenotipos más agresivos de CCR y/o de la adaptación de las células tumorales al nuevo microambiente tisular del hígado^{220,242}.

Además, la heterogeneidad intratumoral también tiene implicaciones en lo que se refiere a la respuesta al tratamiento como veremos en la siguiente sección²⁴³. La coexistencia en un mismo tumor de células sensibles y células resistentes al tratamiento está asociado con la existencia de diferentes clones de células tumorales portadores cada una de ellos de determinadas alteraciones genéticas que les hacen invulnerables a los tratamientos administrados, una de las principales causas de resistencia al tratamiento y de progresión de la enfermedad. Por todo ello, sin duda, el estudio de la heterogeneidad genética del CCR a nivel intra-tumoral, constituye uno de los pilares fundamentales sobre los que asienta la terapia personalizada del futuro para esta enfermedad²³².

2.6. FACTORES MOLECULARES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Los factores que predicen la respuesta al tratamiento pueden ser de dos tipos. En primer lugar, marcadores que predicen la respuesta basada en factores del huésped que determinan la biodisponibilidad y la actividad del agente terapéutico administrado (farmacogenómica) y en segundo lugar, marcadores basados en las características del propio tumor (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de marcadores moleculares predictivos de respuesta a tratamiento en pacientes con CCR (adaptado de Odze⁶⁸)

Objetivo clínico	Marcador molecular
Beneficio de la quimioterapia en enfermedad estadio II de alto riesgo.	Estabilidad de microsatélites
Respuesta a fluorouracilo	Estabilidad de microsatélites Alta expresión de timidilato sintetasa
Respuesta a irinotecán	Alta inestabilidad de microsatélites
Respuesta a Cetuximab	Amplificación de EGFR KRAS nativo Expresión de Amphiregulin Expresión de Epiregulin
Respuesta a quimio y radioterapia preoperatoria	<i>TP53</i> nativo

2.6.1. Respuesta a fluorouracilo

El fluorouracilo ha sido el pilar de la quimioterapia CCR por más de 3 décadas y ha sido objeto de numerosos estudios para identificar biomarcadores de quimiosensibilidad y resistencia. De estos, el marcador más validado es el estado mutacional de los genes reparadores del ADN (MMR), estudiado mediante técnicas de secuenciación o por IHQ⁸⁴. Se ha encontrado que el estado mutacional de MMR está asociado con la respuesta a 5-FU en terapia adyuvante²⁴⁴. En combinación con el buen pronóstico asociado con la deficiencia de MMR, el uso del estado MMR para identificar a los pacientes que probablemente no se beneficiarán de la quimioterapia se está convirtiendo en estándar para el tratamiento de la fase II y III del CCR⁸⁴.

2.6.2.Respuesta a irinotecán

El estado mutacional de MMR se ha asociado con la respuesta al irinotecán, habiéndose descrito que la alteración en el sistema MMR predice la respuesta al irinotecán cuando se añade a 5-FU, en un ensayo controlado de pacientes con enfermedad en estadio III²⁴⁵. Una hipótesis para este mecanismo está relacionada con la sensibilidad de células con alteración en MMR a las roturas de ADN, con la consecuente inducción de la apoptosis, provocado por irinotecán.

2.6.3.Otras alteraciones predictivas de respuesta a la quimioterapia

Se ha centrado mucha atención en alteraciones en la apoptosis y en cómo estas pueden afectar a la respuesta del paciente a la quimioterapia. Entre todos los potenciales marcadores predictivos, el gen *TP53* ha sido uno de los más ampliamente estudiados, habiéndose detectado alteraciones de *TP53* hasta en el 60% de los adenocarcinomas de colon y recto²⁴⁶. En condiciones normales, la proteína codificada por este gen, es un factor de transcripción que desarrolla un papel muy importante en la regulación del ciclo celular y en la muerte celular programada o apoptosis. Diversos estudios han demostrado que las mutaciones de *TP53* pueden estar asociadas con resistencia a una variedad de agentes quimioterapéuticos; sin embargo, lamentablemente estos datos aún no han sido validados y no hay acuerdo sobre la utilidad clínica de este marcador²⁴⁷.

2.6.4.Factores predictivos de respuesta a inhibidores de EGFR

2.6.4.1. MUTACIONES EN RAS

Como hemos visto en secciones anteriores, las mutaciones en *RAS* predicen una falta de eficacia para los agentes que se dirigen al receptor EGFR. En consecuencia, los tumores con *KRAS* y *NRAS* mutados no responden al tratamiento anti-EGFR. Los ensayos iniciales que se realizaron en CCR con Cetuximab (anticuerpo monoclonal que inhibe al receptor de EGFR) requerían la demostración mediante IHQ de la expresión de EGFR en

tejidos tumorales para determinar qué pacientes podrían beneficiarse de este tratamiento. Sin embargo, se observó que no había relación entre el grado de respuesta al tratamiento y los niveles de expresión de EGFR²⁴⁸, y que algunos pacientes respondían bien incluso en ausencia de expresión de EGFR²⁴⁹, lo que sugirió que este anticuerpo podía tener efecto sobre niveles indetectables de expresión de EGFR o sobre otras proteínas de señalización. La activación de la cascada de señalización de EGFR es una vía bien descrita que conduce a la tumorigénesis del colon. Las mutaciones en los oncogenes *RAS* y *BRAF* conducen a la activación constitutiva de EGFR, incluso cuando éste está bloqueado (Figura 14).

Aproximadamente el 40% de CCR muestran mutaciones activadoras en el codón 12, 13 o 61 en el oncogén *KRAS*; y se ha demostrado que la presencia de esta mutación está altamente asociada con la resistencia a los anticuerpos anti-EGFR, Cetuximab y Panitumumab^{250,251,252}. De la misma forma, las mutaciones a nivel de gen *NRAS*, también influyen en la respuesta a la terapia anti-EGFR²⁵³.

La última guía actualizada sobre biomarcadores moleculares para la evaluación del CCR de la American Society for Clinical Pathology (ASCP), College of American Pathologists (CAP), Association for Molecular Pathology (AMP), y la American Society of Clinical Oncology (ASCO) recomienda el estudio del estado mutacional de los genes *KRAS* y *NRAS*, analizando los codones 12 y 13 del exón 2, codones 59 y 61 del exón 3 y codones 117 y 146 del exón 4, en aquellos pacientes con CCR metastásico que se consideren candidatos para la terapia con anti-EGFR^{254,255}. Por lo tanto, la presencia de una mutación tanto en *KRAS* como en *NRAS* contraindica el uso de anticuerpos monoclonales frente EGFR^{256,257,250,258}. También es importante tener en cuenta el tipo de mutación presente en el tumor ya que varios estudios sugieren que los tumores con mutaciones G13D pueden responder a cetuximab^{259,260}, mientras que los últimos estudios indican que las mutaciones en G12D se asocian a un pronóstico adverso, aunque su valor como factor pronóstico en la enfermedad avanzada es controvertido.

2.6.4.2. MUTACIONES EN BRAF

BRAF codifica uno de los principales efectores de *KRAS* y se encuentra mutado entre el 5-10% de pacientes con CCR. De manera análoga a la activación de *KRAS*, las mutaciones de *BRAF* también podrían dar como resultado la señalización constitutiva de la

vía posterior a EGFR y, por lo tanto, predecir la resistencia a Cetuximab. Sin embargo, el estudio de las mutaciones en *BRAF* tiene utilidad limitada como factor pronóstico y predictivo ya que en la actualidad aún no hay estudios suficientes para recomendar el uso del estado mutacional de *BRAF* como biomarcador molecular predictivo de la respuesta a inhibidores de EGFR²⁵⁴. Existen resultados contradictorios en cuanto al beneficio de la terapia anti-EGFR en pacientes con CCR con *RAS* nativo pero con *BRAF* mutado, mientras que los primeros trabajos proporcionaron alguna evidencia de que las mutaciones *BRAF* confieren resistencia al cetuximab^{261,262}, en estudios más recientes no se ha encontrado esta asociación^{263,264}. En la actualidad, el estado de la mutación *BRAF* no se debe utilizar para guiar la terapia con cetuximab^{256,265}, aunque el beneficio con terapias anti-EGFR parece ser muy dudoso. No obstante, la 8ª edición de la clasificación TNM considera que las mutaciones de *BRAF* tienen significado tanto pronóstico (evidencia de nivel 1) como predictivo (evidencia de nivel 1)^{70,264}. La guía de la European Society of Medical Oncology (ESMO) recomienda el estudio mutacional de *BRAF* para la evaluación pronóstica⁹⁰. En este sentido, se está explorando el posible papel de fármacos inhibidores de BRAF. A diferencia de lo que sucede en los melanomas, los anti-BRAF solos no son eficaces en CCR. Existen datos preclínicos que sugieren que la sobreexpresión de EGFR pudiese actuar como mecanismo de escape a los anti-BRAF en CCR. Existen datos preclínicos y clínicos iniciales prometedores con las combinaciones de Anti-BRAF + Anti.EGFR^{266,267}. Está pendiente de estudiar la posible utilidad del uso de inmunomoduladores en CCR con BRAF mutado cuando se asocian a MSI.

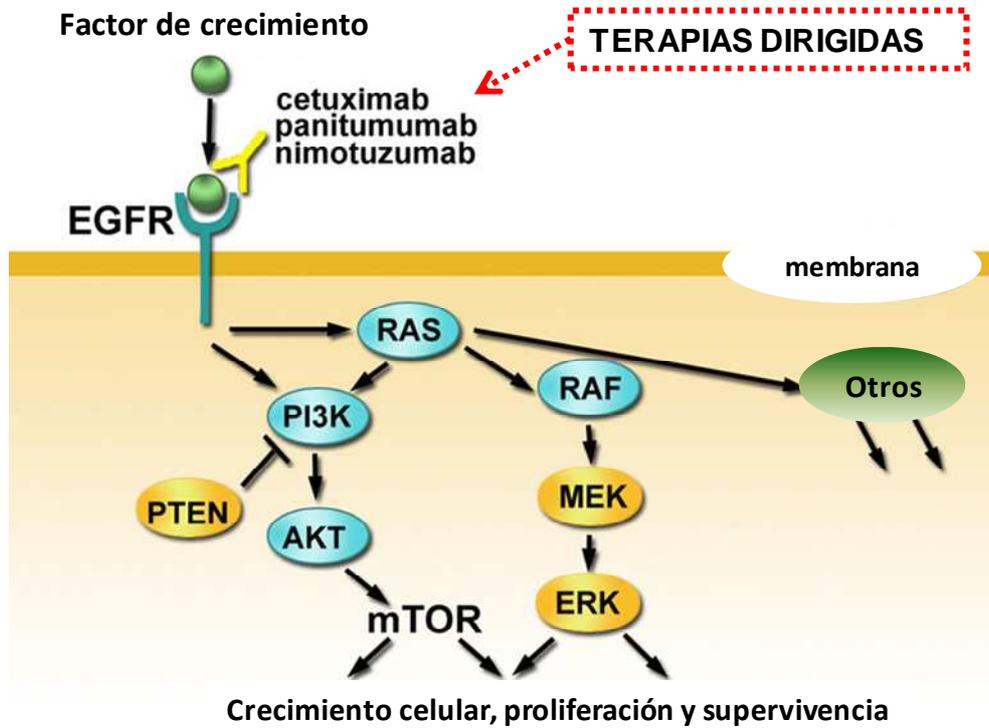
2.6.4.3. MUTACIONES EN PIK3CA Y PTEN

Estudios retrospectivos y no randomizados sugieren que otros biomarcadores podrían ser predictores de una menor eficacia terapéutica de anticuerpos monoclonales anti-EGFR, tales como la presencia de mutaciones en el exón 20 de PIK3CA, o niveles bajos o pérdida de expresión de PTEN (Figura 14). Sin embargo, ninguno de estos biomarcadores ha sido adecuadamente validado en estudios prospectivos y a día de hoy no son de utilidad clínica, aunque su papel debería ser aclarado en el futuro con el fin de seleccionar mejor a los pacientes que se van a beneficiar del tratamiento con anti-EGFR. *PIK3CA* se encuentra mutado aproximadamente en un 15% de CCR. Se ha demostrado que la mutación *PIK3CA* y la posterior activación de la vía AKT desempeñan un papel

importante en la carcinogénesis colorrectal. Las mutaciones en *PIK3CA* se han asociado con mutaciones en *KRAS*²⁶⁸ y ²⁶⁹. Algunos estudios han encontrado que las mutaciones de *PIK3CA* se asocian con resistencia al tratamiento anti-EGFR²⁷⁰, mientras que en otros ensayos clínicos no se han encontrado diferencias²⁷¹. Las mutaciones en los exones 1, 9, y 20 suponen más del 95% de las mutaciones conocidas del gen. La evidencia actual sugiere que solo las mutaciones del exón 20 están asociadas con la resistencia a la terapia anti-EGFR en pacientes con *KRAS* no mutado²⁷². Las mutaciones del exón 9 de *PIK3CA* se asocian con mutaciones en *KRAS* y no tienen un efecto independiente sobre la eficacia del cetuximab²⁷³. Se necesitan más estudios para establecer las funciones pronósticas y predictivas de las mutaciones del exón-9 y del exón-20 de *PIK3CA*. Además, se ha sugerido por algunos estudios retrospectivos^{183,274} que las mutaciones en *PIK3CA* podrían predecir en CCR eficacia del tratamiento con ácido acético salicílico, aunque en otros

IHQ) se consideran biomarcadores emergentes y no está recomendado su estudio de manera rutinaria, aunque pueden emplearse en ensayos clínicos⁹⁰.

Figura 14. Representación esquemática de anticuerpos monoclonales y de las vías de señalización intracelular mediada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Posibles mecanismos de resistencia a la terapia dirigida a EGFR. (Adaptado de Han et al.²⁷⁵).



2.7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÓMICO

A pesar de que cada vez se comprende mejor la patogénesis molecular del CCR y que las técnicas de biología molecular son más accesibles en la práctica rutinaria, la IHQ es considerada la técnica “gold standard”; además el número de anticuerpos disponibles para el patólogo cada vez es mayor. Las técnicas de IHQ en el CCR se pueden utilizar para la caracterización fenotípica del tumor (tipo epitelial o neuroendocrino, estudio y caracterización de metástasis, etc.). El uso más frecuente de la IHQ está aplicada en el estudio de una enfermedad metastásica en la que el CCR es un posible tumor primario. Los órganos donde metastatiza el CCR con mayor frecuencia son el hígado y los pulmones; ambos órganos pueden producir tumores con morfología similar al CCR o ser asiento de metástasis de otros órganos, y en estos casos la IHQ es fundamental para la tipificación del tumor. En algunos casos, la IHQ también puede proporcionar información valiosa para el pronóstico, ya sea de forma independiente o como un marcador sustituto para una ruta específica de carcinogénesis, como la inestabilidad de microsatélites mediante el estudio de las proteínas MMR. En este sentido, se han desarrollado varios marcadores inmunohistoquímicos y moleculares con fines pronósticos y terapéuticos. Actualmente, los marcadores con utilidad clínica que pueden estudiarse a través de las técnicas IHQ incluyen la caracterización de p27, p53, timidilato sintasa²⁷⁶ y EGFR²⁷⁷. Se ha sugerido que la ausencia de expresión de p27 es factor de mal pronóstico, particularmente en el estadio II del CCR, pudiendo ayudar a seleccionar pacientes que se beneficiarán de la terapia adyuvante. La expresión nuclear de p53 también se asocia con una SG más corta y podría ser útil como factor predictor independiente en pacientes en los que el CCR es metastásico a los ganglios linfáticos regionales. La sobreexpresión de la timidilato sintasa también se ha asociado con un mal pronóstico y resistencia a la quimioterapia con 5-fluorouracilo. En la misma línea, varios autores han puesto de manifiesto que la expresión de EGFR también es un indicador de mayor probabilidad de metástasis y disminución de la supervivencia, e incluso varios estudios han señalado que la inmunorreactividad también se asocia con la respuesta clínica a la terapia con cetuximab²⁷⁷; sin embargo, esta última asociación no siempre ha podido ser validada. La pérdida de expresión de SMAD4 (DPC4) también se asocia con un pronóstico adverso en el CCR²⁷⁸. No obstante, la inmunotinción con SMAD4 no tiene utilidad diagnóstica porque también se puede observar pérdida de expresión en otros carcinomas, incluido el páncreas²⁷⁹. La inestabilidad de microsatélites

también se puede estudiar mediante técnicas de IHQ donde se evalúa la expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2^{280,281}. La mutación o ausencia de expresión (consecuencia de la metilación del promotor) de estos genes producen la ausencia de expresión de una o más de las proteínas (inmunotinción negativa), mientras que la positividad de la tinción se traduce que la expresión de la proteína es normal y que no se ha producido mutación. En este sentido, la IHQ es un método sensible (> 90%) y extremadamente específico (casi el 100%) para detectar defectos en las proteínas reparadoras del ADN.

La alta expresión de SATB2 evaluada por IHQ es un marcador independiente de buen pronóstico en CCR y puede modular la sensibilidad a la quimioterapia y la radiación²⁸².

Por otra parte, la IHQ es una técnica importante para la validación de biomarcadores ya que permite la visualización directa de la expresión del biomarcador en el tejido estudiado, además los estudios de IHQ una vez validados pueden introducirse fácilmente en la práctica clínica.

Los estudios genéticos y genómicos en CCR han permitido la caracterización de ciertas alteraciones genéticas claves en la génesis y progresión de la enfermedad, proporcionando además información de gran utilidad para conocer y descifrar la heterogeneidad genética/molecular a nivel intra-tumoral de este tipo de cáncer. Los primeros trabajos destinados a la caracterización genética del CCR emplearon técnicas de CC, basadas en el estudio del cariotipo de las células tumorales^{238,283}. Estos estudios arrojaron luz de las principales alteraciones cromosómicas características de la patología, permitiendo así, identificar las alteraciones responsables de la enfermedad (alteraciones primarias) y las anomalías responsables de la progresión de la misma (alteraciones secundarias) y con ello poder establecer patrones de evolución clonal a nivel intra- e inter-tumoral^{284,243}. Estos métodos, aunque permiten la obtención de una visión global de las alteraciones citogenéticas presentes en la célula tumoral, presentan una baja sensibilidad debido a la necesidad de obtener metafases, la cual se ve acentuada debido a la baja tasa proliferativa de los tejidos tumorales *in vitro*¹⁵⁴ y la posibilidad de que ocurra una selección clonal en cultivo. Otra de las limitaciones de la CC radica en el hecho de que solamente permite el análisis de las células tumorales que se encuentran en metafase, las cuales constituyen < 1% de la celularidad global del tumor. Las técnicas de *i*FISH se han

convertido en una de las técnicas más empleadas para la caracterización genética de los procesos tumorales, permitiendo realizar los estudios sin necesidad de realizar cultivos celulares *in vitro* para la obtención de metafases. Gracias al uso de diferentes fluorocromos la *iFISH* permite la detección simultánea de varias alteraciones genéticas presentes en la célula tumoral de forma individual. La *iFISH* aunque no permite obtener una información global del genoma es aplicable tanto en metafases como en núcleos interfásicos de forma rápida sensible y objetiva^{285,286,287}. Una variante más reciente de la *iFISH* es la hibridación genómica comparada (CGH). Se fundamenta en la hibridación competitiva de 2 moléculas de ADN, el control o referencia y el tumoral, ambos marcados con diferentes fluorocromos y dependiendo de la prevalencia de alguno de los dos fluorocromos, se interpretaran los resultados. Su principal ventaja radica en que no requiere células en división, nos aporta información de ganancias y pérdidas cromosómicas de todo el genoma. Por el contrario, no detecta reordenamientos, inversiones y otras alteraciones de tipo equilibrado. Su principal limitación está relacionada con la sensibilidad de la técnica ya que requiere una infiltración tumoral >40%^{288,289,290}. Posteriormente surgen los microarrays de SNPs, que combina CGH y genotipado de SNPs sobre la misma plataforma, permitiendo el análisis simultáneo del número de copias de ADN y del genotipo con una gran resolución. Esta aproximación permite detectar regiones cromosómicas que sufren LOH. No obstante, también presentan ciertas inconvenientes ya que requiere de un equipamiento costoso, de personal experimentado para su interpretación, no permite identificar traslocaciones y requiere al menos la presencia de un 30% de células tumorales^{288,289,290}. La Tabla 8 recoge las principales ventajas y limitaciones de las diferentes técnicas de análisis genético descritas.

Tabla 8. Ventajas y limitaciones de las técnicas de análisis genético.

TECNICA	VENTAJAS	LIMITACIONES
CC	Información global del genoma Detecta alteraciones numéricas y estructurales	Requiere de metafases (cultivos in vitro) Información restringida a células en metafase Resolución limitada Técnica laboriosa
iFISH	Detección simultánea de varias alteraciones genéticas Detección de traslocaciones e inversiones	No aporta información global del genoma Resolución limitada
aCGH	Información global del genoma Detección de ganancias y pérdidas cromosómicas Elevada resolución (<1Mb)	Sensibilidad limitada (>40% de células tumorales) No detecta reordenamientos equilibrados Equipamiento complejo y de elevado coste Análisis e interpretación de los resultados complejo
SNPs	Información global del genoma Detección de ganancias y pérdidas cromosómicas Detección LOH Elevada resolución (<2.5Kb)	Sensibilidad limitada (>20% de células tumorales) No detecta reordenamientos equilibrados Equipamiento complejo y de elevado coste Análisis e interpretación de los resultados complejo
NGS	Elevada sensibilidad Posibilidad de análisis simultáneo de múltiples genes y de secuenciación completa del genoma	Coste elevado Equipamiento complejo y de elevado coste Análisis bioinformático complejo

CC: Citogenética convencional; iFISH: hibridación in situ fluorescente en interfase; CGH: hibridación genómica comparada; SNP: polimorfismos de nucleótido único; NGS: secuenciación masiva de nueva generación.

Los avances tecnológicos ocurridos en las últimas décadas en el campo de la secuenciación del ADN han dado como fruto las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (NGS), las cuales permiten realizar secuenciaciones del genoma completo, el exoma completo y secuenciación dirigida, centrandose en una selección de genes involucrados en la carcinogénesis, progresión y tratamiento del CCR.²⁹¹ Diferentes investigaciones se han centrado en el análisis mediante esta tecnología de los genes involucrados en la respuesta al tratamiento anti-EGFR, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*^{292,227} y también se han desarrollado paneles de más de 30 genes que pueden diagnosticar y estratificar desde el punto de vista pronóstico a los pacientes con CCR²⁹³.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la actualidad se conoce que el cáncer colorectal (CCR) esporádico es una neoplasia histológica genéticamente heterogénea. No obstante, la información disponible acerca de los patrones genéticos de evolución clonal y de los mecanismos moleculares implicados en la enfermedad (ya sea en su desarrollo y progresión biológica o en su transformación maligna) y su comportamiento clínico, sigue siendo limitado, especialmente en lo que se refiere a la identificación de biomarcadores con utilidad pronóstica y de posibles dianas terapéuticas. Esto adquiere especial relevancia en el CCR dado que este constituye un tumor cuya presentación al diagnóstico típicamente ocurre ya en estadios avanzados de la enfermedad. De hecho, hasta un 30% de los pacientes se presentan de inicio como tumores metastásicos (estadio IV) y del resto, principalmente los diagnosticados en estadios II o III, entre el 20-50% van a progresar a estadios más avanzados y posteriormente a metástasis. En este sentido, la SG a 5 años es de aproximadamente el 50%, llegando a ser del 10% en los pacientes con enfermedad a distancia. Todo ello condiciona que el CCR continúe constituyendo una neoplasia maligna, con una elevadísima tasa de mortalidad a los 5 años.

Un número creciente de estudios indica que el comportamiento clínico y biológico de una neoplasia depende en gran medida de las alteraciones genéticas subyacentes y de las interacciones entre las células tumorales y el microambiente que las rodea, traducidas a su vez en distintos perfiles genéticos, que para el CCR, siguen sin conocerse en profundidad, especialmente en lo que se refiere a las distintas vías de evolución clonal existentes a nivel intra-tumoral asociadas a tratamiento. En este sentido, para el empleo de los nuevos tratamientos basados en el uso de anticuerpos monoclonales frente al gen *EGFR*, es imprescindible el conocimiento del estado mutacional de los genes

KRAS, *NRAS*, *PIK3CA*, *BRAF* y *TP53* debido a su valor predictivo negativo de respuesta. Sólo un porcentaje de estos pacientes se benefician de esta terapia debido fundamentalmente a la presencia de mutaciones en *KRAS*, que se encuentran en la literatura en alrededor de un 40%, dependiendo de las series analizadas. Además, en el momento de iniciar este estudio se desconocía el impacto pronóstico del estado mutacional de estos genes.

Actualmente, las mutaciones de estos genes se evalúan sobre el ADN extraído del tejido tumoral correspondiente al tumor primario o bien a metástasis (resección tumoral o biopsias) embebido en parafina y fijado con formalina sin tener en cuenta la heterogeneidad genética entre las diferentes muestras tumorales presentes en cada uno de los pacientes (tumor primario, ganglios y metástasis hepáticas). Las mutaciones en estos genes pueden aparecer de novo, como resistencia al tratamiento del tumor primario o bien estar presentes en un pequeño clon, no detectable en el tumor inicial. Estos hallazgos podrían explicar las altas tasas de recaída y los tumores refractarios tratados con anticuerpos monoclonales.

Existen diferentes metodologías para el abordaje de estos estudios si bien la secuenciación masiva mediante el empleo de paneles dirigidos se postula como la técnica de elección en nuestros días dada su alta sensibilidad, especificidad y el descenso de los costes. Además, la utilización de técnicas que permiten el análisis de las alteraciones cromosómicas a nivel de células individuales, en combinación con técnicas moleculares de análisis global del genoma y su perfil de expresión, nos permitirá profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad genética y de las vías de evolución clonal existentes, tanto a nivel intratumoral en cada paciente, como a nivel inter-tumoral entre distintos pacientes con CCR, proporcionando así información clave para determinar el impacto de las distintas alteraciones genéticas en el comportamiento biológico, histopatológico, clínico y pronóstico del CCR.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo doctoral nos hemos planteado como **objetivo general** profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad genética del CCR, con especial énfasis en las vías de evolución clonal presentes a nivel intra-tumoral asociadas al estado mutacional de los genes implicados en la vía de señalización EGFR, y su impacto en el comportamiento clínico y biológico de la enfermedad. Para ello hemos delineado cuatro **objetivos específicos**:

1. Establecer la incidencia del estado mutacional de los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *TP53* mediante técnicas de secuenciación masiva en una serie amplia de pacientes de Castilla y León diagnosticados de CCR esporádico.

2. Identificar, estudiando las mutaciones más frecuentes en CCR mediante de arrays de baja densidad, la presencia de diferentes subclones de células neoplásicas a nivel intra-tumoral y establecer las posibles relaciones evolutivas existentes entre ellos, con el fin de identificar las vías de evolución clonal presentes en el CCR (tumor primario, metástasis hepáticas y ganglios linfáticos metastásicos).

3. Determinar, mediante arrays de expresión (ARNm y miARNs) y técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), los perfiles de expresión de las proteínas más frecuentemente alteradas en CCR, tomando como modelo la comparación entre tumores metastásicos vs. no metastásicos.

4. Establecer la posible asociación existente entre las mutaciones detectadas en *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *TP53* y los perfiles de expresión con el comportamiento clínico, biológico y evolutivo del tumor, con especial énfasis en la identificación de aquellas anomalías asociadas a una menor supervivencia.

IV. MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

En esta sección de la memoria se describen los pacientes y los materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos planteados, mediante la inclusión de los artículos científicos originales redactados y publicados como consecuencia del trabajo realizado. Cada uno de los artículos referidos está precedido de un breve resumen en castellano que facilita una revisión rápida de la información contenida en los mismos.

Los artículos incluidos en este apartado son:

1. Combined assessment of the TNM stage and BRAF mutational status at diagnosis in sporadic colorectal cancer patients.

José María Sayagués*, **Sofía Del Carmen***, María Del Mar Abad, Luís Antonio Corchete, Oscar Bengoechea, María Fernanda Anduaga, María Jesús Baldeón, Juan Jesús Cruz, José Antonio Alcázar, María Angoso, Marcos González, Jacinto García⁴, Luís Muñoz-Bellvis, Alberto Orfao, and María Eugenia Sarasquete.

*These authors have contributed equally to this work and they should be considered as first authors

Oncotarget, 8 de Mayo, 2018

2. Spatio-temporal tumor heterogeneity in metastatic CRC tumors: a mutational-based approach.

Sofía del Carmen, José María Sayagués, Oscar Bengoechea, María Fernanda Anduaga, José Antonio Alcázar, Ruth Gervás, Jacinto García, Alberto Orfao, Luis Muñoz Bellvis, María Eugenia Sarasquete and María del Mar Abad.

Oncotarget, 28 de Septiembre, 2018.

3. Clinicopathological features and prognostic implications of EGFR protein expression in sporadic colorectal tumors. Correlation with copy number status, mRNA levels and miRNAs regulation.

Sofía del Carmen, Luis Antonio Corchete, Ruth Gervás, Alba Rodríguez-Carreño, María García-Muñoz, José Antonio Alcázar, Jacinto García, Oscar Bengoechea, María Eugenia Sarasquete, Luis Muñoz Bellvis, José María Sayagués and María del Mar Abad.

Scientific Reports 2019; enviado

1. Artículo 1: “Evaluación combinada del estadio TNM y el estado mutacional del gen *BRAF* en pacientes con cáncer colorrectal esporádico en el momento del diagnóstico”

OBJETIVOS: El impacto pronóstico del estado mutacional del gen *KRAS*, así como de aquellos genes que participan en la vía EGFR (*BRAF*, *NRAS* y *TP53*) en cáncer colorrectal (CCR) esporádico continua siendo controvertido, en particular con respecto a su impacto en la supervivencia y el pronóstico de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue explorar la frecuencia de estas mutaciones en el tumor primario, correlacionar dicha frecuencia con las características clínicas e histopatológicas del tumor y finalmente determinar su potencial impacto en el pronóstico en la recurrencia temprana de pacientes con CCR.

MATERIAL Y MÉTODOS: Para llevar a cabo este estudio, diseñamos un panel customizado de amplicones para la identificación simultánea de mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS* (exones 2, 3 y 4), *BRAF* (exón 15) y *TP53* (región codificante completa) mediante técnicas de secuenciación masiva en una serie de 87 pacientes con CCR esporádico y en una muestra de ADN control (Quantitative Multiplex DNA reference standard, Horizon Discovery, Cambridge, UK) para su validación y determinación de la sensibilidad.

RESULTADOS: El panel amplificó con éxito los 53 amplicones, con una profundidad media de lecturas de 2400x en todas las muestras analizadas y de la muestra de ADN control. El análisis de la muestra control permitió detectar la variante *KRAS* G12D presente en una frecuencia alélica del 6%. Cuarenta y seis de los 87 casos (53%) mostraron mutaciones en al menos uno de los genes estudiados, siendo el gen más frecuentemente mutado *TP53* (53%), seguido de *KRAS* (28%), *BRAF* (7%) y *NRAS* (1%). Las mutaciones en el gen *KRAS* fueron detectadas con mayor frecuencia en tumores localizados en el colon derecho ($p=0.049$), bien diferenciados ($p=0.035$) y en ausencia de invasión linfovascular ($p=0.05$). A su vez las mutaciones del gen *BRAF* se asociaron a una

histología pobre o moderadamente diferenciada ($p=0.023$), presencia de carcinomatosis peritoneal ($p=0.006$) e inestabilidad de microsatélites ($p=0.007$). Las mutaciones en *TP53* fueron más frecuentes en varones ($p=0.05$). Desde el punto de vista pronóstico, el estado mutacional de *BRAF* y el estadio TNM en el momento de diagnóstico fueron las únicas variables con valor pronóstico independiente en el análisis multivariante, con un impacto adverso sobre la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG). De acuerdo con estas variables, los pacientes se clasificaron en tres grupos pronósticos con diferentes tasas de SLE (porcentaje libre de progresión a los 2 años del 91% frente al 77% frente al 0%, respectivamente, $p < 0,0001$). Este hallazgo fue validado en una serie independiente de pacientes con CCR ($n=553$) de la base pública de datos GEO (GSE39582).

CONCLUSIONES: La secuenciación masiva es una herramienta útil y sensible para la detección de las distintas variantes presentes la muestra tumoral en el momento del diagnóstico en pacientes con CCR. La evaluación combinada del estadio TNM y las mutaciones de *BRAF* en el momento del diagnóstico proporciona información pronóstica independiente para la detección de grupo de pacientes con recurrencia temprana.

Combined assessment of the TNM stage and *BRAF* mutational status at diagnosis in sporadic colorectal cancer patients

José María Sayagués^{1,*}, Sofía Del Carmen^{2,*}, María Del Mar Abad², Luís Antonio Corchete³, Oscar Bengoechea², María Fernanda Anduaga⁴, María Jesús Baldeón⁵, Juan Jesús Cruz⁵, Jose Antonio Alcazar⁴, María Angoso⁴, Marcos González³, Jacinto García^{4,**}, Luís Muñoz-Bellvis^{4,**}, Alberto Orfao^{1,**} and María Eugenia Sarasquete^{3,**}

¹Cytometry Service-NUCLEUS, Department of Medicine, Cancer Research Center (IBMCC-CSIC/USAL), CIBERONC and IBSAL (University Hospital of Salamanca), Salamanca, Spain

²Department of Pathology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

³Cáncer Research Center and Service of Hematology (University Hospital of Salamanca), Salamanca, Spain

⁴Service of General and Gastrointestinal Surgery, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁵Department of Oncology (University Hospital of Salamanca) and IBSAL (University Hospital of Salamanca), Salamanca, Spain

*These authors have contributed equally to this work and they should be considered as first authors

**These authors have contributed equally to this work and they should both be considered as senior last authors and corresponding authors

Correspondence to: Alberto Orfao, email: orfao@usal.es

Keywords: colorectal cancer; anti-EGFR therapy; *BRAF* V600E mutation; prognosis

Received: June 14, 2017

Accepted: April 06, 2018

Published: May 08, 2018

Copyright: Sayagués et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The prognostic impact of *KRAS* mutations and other *KRAS*-related and non-related genes such as *BRAF*, *NRAS* and *TP53*, on sporadic colorectal cancer (sCRC) remain controversial and/or have not been fully established. Here we investigated the frequency of such mutations in primary sCRC tumors and their impact on patient progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). Primary tumor tissues from 87 sCRC patients were analysed using a custom-built next generation sequencing (NGS) panel to assess the hotspot mutated regions of *KRAS/NRAS* (exons 2, 3 and 4), *BRAF* (exon 15) and *TP53* (all exons). Overall, mutations in these genes were detected in 46/87 sCRC tumors analyzed (53%) with the following frequencies per gene: *TP53*, 33%; *KRAS*, 28%; *BRAF*, 7%; and *NRAS*, 1%. A significant association was found between *KRAS* mutations and right side colon tumor location ($p=0.05$), well-differentiated tumors ($p=0.04$) and absence of lymphovascular invasion ($p=0.05$). In turn, *BRAF*-mutated tumors frequently corresponded to poorly- or moderately-differentiated sCRC ($p=0.02$) and showed a higher frequency of peritoneal carcinomatosis ($p=0.006$) and microsatellite instability ($p=0.007$). From the prognostic point of view, the *BRAF* mutational status together with the TNM stage were the only variables that showed an independent adverse impact on patient outcome in the multivariate analyses for both PFS and OS. Based on these results a scoring system was built and patients were classified into three prognostic subgroups with different PFS rates at 2 years: 91% vs. 77% vs. 0%, respectively ($p<0.0001$). Additional prospective studies in larger series of sCRC patients where mutations in genes other than those investigated here are required to validate the utility of the proposed predictive model.

INTRODUCTION

Sporadic colorectal cancer (sCRC) ranks the third most common type of cancer worldwide, both in men and women, and the fourth leading cause of cancer-related death [1, 2]. In the last decades, the introduction of targeted therapies has led to great progress in tumor response to treatment and patient survival in many cancer types, including sCRC, but only selected subgroups of patients within a given tumor type may benefit from these novel agents (e.g. anti-EGFR and anti-VEGF therapies) based on better responses to therapy and a significantly improved outcome [3]. At present, the prognostic impact of KRAS mutations, and of mutations in other KRAS-related and unrelated genes such as NRAS and TP53 frequently mutated in sCRC, remains controversial, particularly as regards their impact on patient progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) [4–6]. Despite this, the presence of KRAS and NRAS gene mutations, currently precludes administration of anti-EGFR directed therapies in sCRC patients; this translating into a lack of benefit of such novel therapies in this large subgroup of sCRC patients [7]. In turn, preliminary data suggests that the activating BRAF V600E mutation that occurs in a smaller fraction (5-10%) of sCRC patients who lack KRAS mutations, might be associated with a worse patient outcome [8] and significantly shorter OS rates. [9, 10]. Similarly, NRAS mutations occur in only a small fraction (1-6%) of all colorectal tumors [11] and they have been associated with reduced response to monoclonal antibody therapies [12], its potential prognostic value among early stage tumors, still requiring further confirmation in larger series of unselected sCRC patients. Finally, despite TP53 mutations are frequently detected in colorectal tumors (~40% of cases), their specific prognostic impact on the outcome and survival of sCRC patients, still remains controversial.

Since 2013, the European Medicines Agency (EMA) requires that exons 2-3-4 of both KRAS and NRAS are investigated prior to usage of novel targeted (e.g. anti-EGFR) therapies. From the onward, the number of molecular targets required to be analyzed in sCRC tumors has further expanded and it is expected to increase even more in the near future. Because of this (and other reasons) Sanger sequencing and other traditional sequencing approaches that interrogate the tumor DNA for specific variants of one (or a few) genes are being progressively replaced by next-generation sequencing (NGS). NGS allows simultaneous analysis of multiple gene targets with higher sensitivity, and at lower cost, using reduced amounts of DNA [13]. Thus, an NGS-based approach for simultaneous evaluation of KRAS, NRAS, BRAF, and TP53 gene mutations in hotspot regions suitable for implementation into routine diagnostics in sCRC patients would be mostly welcome.

Other genes that are recurrently mutated in sCRC and that have been associated to tumor response to therapy and/or the outcome of sCRC patients such as the SMAD4 and PIK3CA genes present in ~10-35% and 10%-20% of cases, respectively [14–16], were not considered in the gene panel built for this study.

In the present study, we designed an NGS-based approach for simultaneous identification of hotspot KRAS, NRAS, BRAF and TP53 gene mutations in 87 primary sCRC tumors and evaluated the prognostic impact of the mutations identified in patient PFS and OS. Overall, the BRAF V600E mutation emerged as an independent prognostic factor for both PFS and OS, together with the TNM stage; based on the combined assessment of both parameters at diagnosis a prognostic score was built for stratification of sCRC patients into 3 risk groups with significantly different PFS rates.

RESULTS

Patient characteristics

Overall, 87 patients diagnosed with sCRC at the HUS (51 males and 36 females; median age of 72 years, ranging from 38 to 91 years) were studied. Median follow-up at the moment of closing the study was 19 months (range: 8 to 36 months). According to the histological type, 80 cases corresponded to adenocarcinomas, 4 cases to signet ring cell carcinomas, 2 cases to mucinous adenocarcinomas and one case to a neuroendocrine tumor. According to tumor grade, 24 cases were classified as well-differentiated tumors, 49 as moderately- and 7 as poorly-differentiated carcinomas. In all cases, histopathological grade was systematically confirmed in a second independent evaluation by another experienced pathologist. The most relevant clinical and laboratory data for each individual sCRC patient studied are summarized in Table 1.

Eighty-five patients underwent complete tumor resection (R0), while the remaining two cases showed positive tumor tissue margins to be affected (one patient showed microscopical and one macroscopical involvement). Adjuvant treatment was administered to 34/87 cases (39%) including: Xelox in 17/34 patients (50%), Capecitabine in 12 cases (35%), Tomox in another 2 (6%), Tomudex in 1 case (3%), Utefox in another patient (3%) and cisplatin etoposide in the remaining case (3%).

NGS quality control

The custom NGS panel here designed, successfully amplified the 53 targeted amplicons, (covering the corresponding 5.3kb) with a mean depth of 2400x reads in all tumor samples analyzed (Supplementary Table 1). The reference sample, which included several mutations

Table 1: Clinical and biological characteristics of sporadic colorectal cancer (sCRC) patients analyzed in this study (n=87)

Disease features	Distribution
Age (years)*	72 (38-91)
Gender	
Female	36 (41%)
Male	51 (59%)
Site of primary tumor	
Right colon	44 (51%)
Left colon	39 (44%)
Rectum	4 (5%)
Histological type	
Adenocarcinoma	80 (92%)
Signet ring cell carcinoma	4 (5%)
Mucinous adenocarcinoma	2 (2%)
Neuroendocrine tumor	1 (1%)
Grade of differentiation[§]	
Well-differentiated	24 (30%)
Moderate-differentiated	49 (61%)
Poorly-differentiated	7 (9%)
Histopathologic tumor classification	
pTis	3 (3%)
pT1	3 (3%)
pT2	20 (23%)
pT3	48 (56%)
pT4a	10 (12%)
pT4b	3 (3%)
Histopathologic lymph node status	
pN0	46 (53%)
pN1	25 (29%)
pN2	16 (18%)
Metastatic status	
M0	68 (78%)
M1	19 (22%)
TNM stage at diagnosis	
Stage 0	3 (3%)
Stage I	16 (19%)
Stage II	27 (31%)
Stage III	35 (40%)
Stage IV	6 (7%)

(Continued)

Disease features	Distribution
Tumor size (cm)*	4 (0.3-13)
CEA serum levels*	3.5 (0.5-35)
≤5 ng/ml	47 (62%)
>5 ng/ml	29 (38%)
Lymphovascular invasion	
No	68 (78%)
Yes	19 (22%)
Perineural invasion	
No	65 (75%)
Yes	22 (25%)
Adjuvant treatment	
No	43 (61%)
Yes	34 (39%)
Local recurrence	
No	69 (79%)
Yes	18 (21%)
OS (months)*	19 (3-37)

Results expressed as number of cases (percentage) or *as median (range). [§]In 7 patients the grade of differentiation was not determined because of a histological type not corresponding to an adenocarcinoma: 2 signet ring cell carcinomas, 4 mucinous colorectal adenocarcinomas and one neuroendocrine tumor; CEA: carcinoembryonic antigen; OS: overall survival.

Table 2: Variant allele frequencies (VAF) observed for the most common *BRAF* (V600E), *KRAS* (G12D, G13D) and *NRAS* (Q61K) mutations identified in the reference sample (Quantitative Multiplex DNA reference standard (Horizon Discovery, Cambridge, UK) used in this study by our NGS approach

Variant alleles detected by NGS					
Gene	Mutation	Altered read depth	Total Read depth	VAF detected by NGS	Expected VAF
<i>BRAF</i>	V600E	600	6607	9.1%	10.5%
<i>KRAS</i>	G13D	269	1733	15%	15%
<i>KRAS</i>	G12D	175	1854	9.4%	6%
<i>NRAS</i>	Q61K	141	829	17%	12%

NGS: next generation sequencing; VAF: variant allele frequency.

Expected VAF (last column) was estimated according to the manufacturer information based on the number of copies of the mutation per microliter and the input of reference sample added to the reaction.

interrogated by our custom panel –e.g. *KRAS* (G12D and G13D), *NRAS* (Q61K) and *BRAF* (V600E)- was also successfully analyzed, the variant allele frequencies (VAF) detected by NGS being very similar to the expected VAF as estimated by the DNA input (Table 2). According to these results, our panel allows detection of variants at low VAF as confirmed by the detection of *KRAS* G12D variant (6% VAF).

Frequency and type of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *TP53* mutations detected

Overall, mutations were detected in 46/87 cases analyzed (53%). The *TP53* gene was the most frequently mutated gene (29/87 tumors; 33%), followed by the *KRAS* (mutated in 24/87 tumors; 28%) and *BRAF* (6/87 tumors; 7%) genes, while the *NRAS* gene was mutated

Table 3: Overall distribution of the *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *TP53* gene mutations detected by next generation sequencing in the 87 colorectal cancer patients analyzed

Gene status	N. of cases (%)	Exon location	Mutation (N. of cases)
<i>KRAS</i>			
Wild type	63 (72%)		
Mutated	24 (28%)		
		Exon 2	G12D(7), G12V(5), G12A(4), G12S(1), G13D(2)
		Exon 3	Q61H(1), Q61L(1)
		Exon 4	A146P(1), A146T(1), K147E(1)
<i>NRAS</i>			
Wild type	86 (99%)		
Mutated	1 (1%)		
		Exon 3	Q61K(1)
<i>BRAF</i>			
Wild type	81 (93%)		
Mutated	6 (7%)		
		Exon 15	V600E (6)
<i>TP53</i>			
Wild type	58 (66%)		
Mutated	29 (33%)		
		Exon 4	L111R (1), G112del (1)
		Exon 5	C135F (1), P152AfsTer14 (1), R156H (1), R158C (1), V173L (1), R175H (3), H178PfsTer47 (1), c.376-2A>G splice (1)
		Exon 6	Q192* (1), R196* (1), L201GfsTer47 (1), S215R (1).
		Exon 7	R248W (2), R248Q (1), C275Y (1), N247I (1), T253PfsTer92 (1)
		Exon 8	R282W (3), R273C (1), C277VfsTer68 (1), V272M (1)
		Exon 10	S366A (1)

Results expressed as number of cases (percentage).

in only one case (1%). The specific VAF for each individual mutation identified is listed in Supplementary Table 2. Regarding the individual hotspot mutations identified, *KRAS* G12D (8% of cases) and G12V (6%) corresponded to those showing the highest frequencies, followed by *BRAF* V600E (7%) and the *TP53* R282W (3%) and R175H (3%) variants (Table 3). Thirty-two cases (37%) showed one single mutation (the most common being *KRAS*), while 14 cases (16%) had two genes affected. Coexisting *TP53* and *BRAF* mutations

were present in four cases (5%) whereas *TP53* and *KRAS* were simultaneously mutated in 10 (11%) patients (Figure 1). As expected, no single case carried (simultaneously) *KRAS* and *BRAF* mutations (Figure 1).

Association between the mutational profile of sCRC tumors and other features of the disease

Once sCRC patients with and without mutations in the EGFR-pathway were compared, similar disease

features were observed for the two patient groups, for most parameters analyzed including therapy (Table 4). Despite this, tumors with *KRAS* mutations were more frequently localized in the right colon ($p=0.05$), corresponded to well-differentiated tumors ($p=0.04$) and displayed no lymphovascular invasion ($p=0.05$). In contrast *BRAF* mutated sCRC tumors were significantly associated with a poorly- or moderately- differentiated histopathology ($p=0.02$), peritoneal carcinomatosis ($p=0.006$) and microsatellite instability ($p=0.007$). In turn, patients who displayed *TP53* mutations showed a greater prevalence in males ($p=0.05$). No further statistically significant associations were found between the mutational status of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *TP53* and patient age, the histological subtype of the tumor, tumor stage, presence of lymph node involvement and metastases, tumor size, CEA serum levels and the presence of perineural invasion. For these later variables that did not achieve a statistically significant association, a post-hoc power estimation was performed which showed limited power (<0.8) to detect potential associations due to small sample size (Supplementary Table 3).

From all mutations identified only the *BRAF* mutational status showed a statistically significant association with the microsatellite status with 2/48 microsatellite stable (MSS) patients (4%) and 3/6 microsatellite instable (MSI) cases (50%) being *BRAF*-mutated ($p=0.007$).

Prognostic impact of the *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *TP53* mutational status

In total, 74/87 patients were included in survival analyses. The other 13 patients were excluded because they had sCRC tumors other than adenocarcinoma ($n=7$), died within the first 30 days after surgery ($n=4$) and/or did not undergo complete resection of the tumor ($n=2$). From the prognostic point of view, the *BRAF* mutation was the only mutation that had an adverse impact on PFS (median 2-year PFS of 60% vs. 79% for wild type *BRAF* tumors; $p=0.05$) (Table 5) and OS (median 2-year OS of 80% vs. 94% for wild type *BRAF*; $p=0.001$). Other clinical, biological and histopathologic characteristics of the disease that displayed a significant adverse influence on PFS in the univariate analysis included: female gender (2-year PFS rates of 63% vs. 90% in males; $p=0.03$), advanced TNM stage (2-year PFS rates of 0% for stage IV vs. 75% for stage III and 91% for stages 0-II; $p<0.001$), and the tumor grade of differentiation (2-year PFS rates of 95% for well-differentiated vs. 77% for moderately- and 33% for poorly-differentiated tumors; $p=0.03$), the presence of lymphovascular involvement at diagnosis (2-year PFS rates of 54% vs. 83% for cases who showed no lymphovascular invasion; $p=0.004$), and perineural invasion (2-year PFS rates of 62% vs. 83% for cases who had no perineural invasion; $p=0.03$) (Table 5). Multivariate analysis of prognostic factors showed that the TNM stage at diagnosis, together with the *BRAF* mutational status

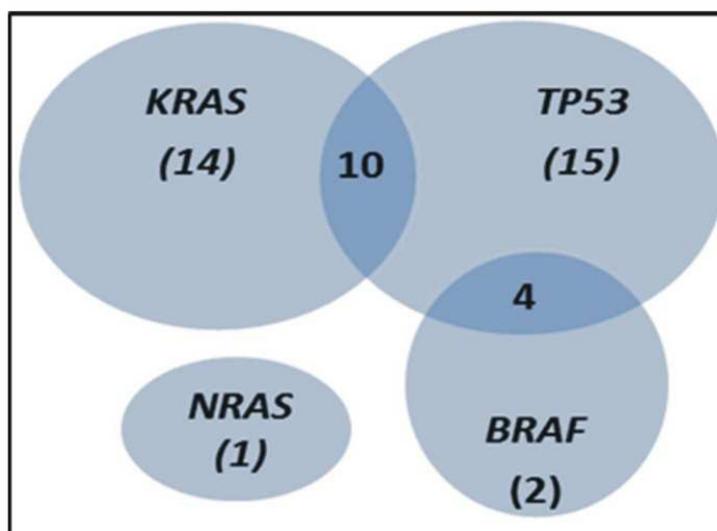


Figure 1: Venn diagram showing the distribution of *KRAS*, *NRAS*, *TP53* and *BRAF* mutations in the 87 sporadic colorectal cancer (sCRC) patients analysed in this study. The number of mutated cases for each mutational profile is shown between brackets.

Table 4: Mutational status of the *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *TP53* genes and their association with other clinical, biological and histopathological features of sporadic colorectal cancer (sCRC) patients (n=87)

Variable	Categories	N. of Cases (%)	<i>KRAS</i> Mutation (%)	<i>P-value</i>	<i>NRAS</i> Mutation (%)	<i>P-value</i>	<i>BRAF</i> Mutation (%)	<i>P-value</i>	<i>TP53</i> Mutation (%)	<i>P-value</i>
Age (years)	< 72	43 (49)	14 (33)	NS	1 (2)	NS	2 (5)	NS	18 (42)	NS
	≥ 72	44 (51)	10 (23)		0 (0)		4 (9)		11 (25)	
Gender	Male	51 (59)	12 (24)	NS	1 (2)	NS	3 (6)	NS	21 (41)	0.05
	Female	36 (41)	12 (33)		0 (0)		3 (8)		8 (22)	
Site of primary tumor	Right Colon	44 (51)	17 (39)		1 (2)		5 (11)		14 (32)	
	Left Colon	39 (45)	7 (18)	0.05	0 (0)	NS	1 (3)	NS	15 (38)	NS
	Rectum	4 (4)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
Histological type	Adenocarcinoma	80 (92)	24 (30)		1 (1)		5 (6)		27 (44)	
	Signet ring cell carcinoma	4 (5)	0 (0)	NS	0 (0)	NS	0 (0)	NS	1 (25)	NS
	Mucinous adenocarcinoma	2 (2)	0 (0)		0 (0)		1 (2)		1 (50)	
	Neuroendocrine tumor	1 (1)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
Grade of differentiation	Well	24 (30)	12 (50)		0 (0)		0 (0)		11 (46)	
	Moderate	49 (61)	10 (20)	0.04	1 (2)	NS	3 (6)	0.02	13 (27)	NS
	Poor	7 (9)	2 (29)		0 (0)		2 (29)		3 (43)	
TNM Stage at diagnosis	0	3 (3)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
	I	16 (19)	5 (31)		0 (0)		2 (0)		5 (31)	
	II	27 (31)	11 (41)	NS	1 (4)	NS	0 (0)	NS	8 (30)	NS
	III	35 (40)	7 (20)		0 (0)		3 (9)		13 (37)	
	IV	6 (7)	1 (17)		0 (0)		1 (17)		3 (50)	
pN	N0	46 (53)	16 (35)		1 (2)		2 (4)		13 (28)	
	N1	25 (29)	5 (20)	NS	0 (0)	NS	3 (12)	NS	9 (36)	NS
	N2	16 (18)	3 (19)		0 (0)		1 (16)		7 (44)	
Metastases	No	68 (78)	21 (31)	NS	1 (2)	NS	3 (16)	NS	23 (34)	NS
	Yes	19 (22)	3 (16)		0 (0)		3 (4)		6 (32)	
Peritoneal carcinomatosis	No	80 (91)	23 (29)	NS	1 (1)	NS	3 (4)	0.006	27 (34)	NS
	Yes	7 (9)	1 (14)		0 (0)		3 (43)		2 (29)	
Tumor size	<4 cm	39 (40)	9 (23)	NS	1 (2)	NS	2 (5)	NS	13 (33)	NS
	≥4 cm	48 (60)	15 (31)		0 (0)		4 (9)		16 (34)	
CEA serum levels	≤5 ng/ml	50 (40)	13 (26)	NS	0 (0)	NS	4 (8)	NS	19 (38)	NS
	>5 ng/ml	31 (60)	10 (32)		1 (3)		1 (3)		8 (26)	
Lymphovascular Invasion	No	68 (78)	22 (32)	0.05	1 (2)	NS	4 (6)	NS	22 (32)	
	Yes	19 (22)	2 (11)		0 (0)		2 (11)		7 (37)	NS

(Continued)

Variable	Categories	N. of Cases (%)	KRAS Mutation (%)	P-value	NRAS Mutation (%)	P-value	BRAF Mutation (%)	P-value	TP53 Mutation (%)	P-value
Perineural Invasion	No	65 (75)	21 (32)	NS	0 (0)	NS	4 (6)	NS	19 (29)	NS
	Yes	22 (25)	3 (14)		1 (5)		2 (9)		10 (46)	
Microsatellite instability	No	48 (89)	16 (33)	NS	0 (0)	NS	2 (4)	0.007	21 (44)	NS
	Yes	6 (11)	0 (0)		0 (0)		3 (50)		1 (17)	
Adjuvant therapy	No	42 (55)	16 (38)	NS	1 (2)	NS	3 (7)	NS	13 (31)	NS
	Yes	34 (45)	7 (21)		0 (0)		2 (6)		13 (38)	

*Results expressed as median (range) or as #number of cases (percentage); NS: statistically no significant differences detected ($p > .05$); CEA: carcinoembryonic antigen.

Table 5: Clinical, biological, genetic and therapeutic characteristics of sporadic colorectal cancer (sCRC) patients (n=74) with an impact on progression-free survival (PFS) and overall survival (OS)

Variable	PFS					OS			
	N	% 2-year PFS	Univariate analysis	Multivariate analysis	HR (95% CI)	% 2-year OS	Univariate analysis	Multivariate analysis	HR (95% CI)
Age									
<72 years	40	81%	NS			100%	NS		
≥72 years	34	74%				84%			
Gender									
Male	41	90%	0.03	NS		93%	NS		
Female	33	63%				94%			
Site of primary tumor									
Right colon	37	75%	NS			88%	NS		
Left colon	34	82%				97%			
Rectum	3	67%				100%			
TNM stage at diagnosis									
Stage 0/I/II	42	91%	<0.001	0.001	2.77(1.55-4.96)	97%	0.02	NS	
Stage III	26	75%				88%			
Stage IV	6	0%				80%			
Grade of differentiation									
Well	22	95%	0.03	NS		91%	NS		
Moderate	46	77%				97%			
Poor	6	33%				83%			
CEA serum levels									
≤5 ng/ml	45	80%	NS			96%	NS		
>5 ng/ml	24	75%				92%			
Tumor size									
<4 cm	44	83%	NS			100%	0.005	NS	
≥4 cm	30	70%				81%			
Lymphovascular invasion									
No	60	83%	0.004	NS		95%	NS		
Yes	14	54%				84%			

(Continued)

Variable	PFS					OS			
	N	% 2-year PFS	Univariate analysis	Multivariate analysis	HR (95% CI)	% 2-year OS	Univariate analysis	Multivariate analysis	HR (95% CI)
Perineural invasion									
No	57	83%	0.03	NS		93%	NS		
Yes	17	62%				93%			
Microsatellite instability †									
No	43	72%	NS			92%	0.01	NS	
Yes	5	60%				40%			
BRAF									
Wild type	69	79%	0.05	0.045	4.9 (1.04-23.75)	94%	0.001	0.02	4.4 (0.7-28)
Mutated	5	60%				80%			
KRAS									
Wild type	50	68%	NS			90%	NS		
Mutated	24	77%				100%			
NRAS									
Wild type	73	77%	NS			93%	NS		
Mutated	1	100%				100%			
TP53									
Wild type	47	81%	NS			93%	NS		
Mutated	27	77%				83%			
Adjuvant therapy									
No	40	84%	NS			97%	NS		
Yes	34	70%				96%			

*Results expressed as number of cases (percentage); NS: statistically no significant differences detected, ($p > .05$); CEA: carcinoembryonic antigen. †MSI status variable was not included in the multivariate analysis because MSI information was available only in a subset of 54 cases.

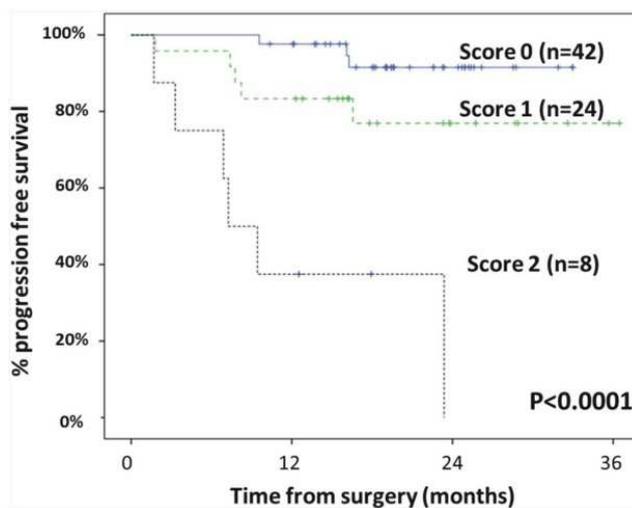


Figure 2: Progression-free survival (PFS) of sCRC patients stratified by the prognostic score proposed in the present study. This prognostic score was established based on the most informative variables predicting for the PFS (TNM stage at diagnosis and the mutational status for the *BRAF* gene), as follows: score 0, TNM stage 0-II; score 1, TNM stage III patients with wild-type *BRAF*; score 2, TNM stage III cases with *BRAF* mutations plus TNM stage IV cases.

were the only independent variables predicting for PFS -HR=2.77, 95%CI of 1.55-4.96 (p=0.001) and HR=4.9, 95%CI of 1.04-23.75 (p=0.05) respectively- (Table 5).

Based on the above results, a prognostic score was established and applied to each patient, which was based on the TNM stage and the presence vs. absence of *BRAF* mutations. Thus, patients with an early TNM stage (stage 0, I or II) were considered low-risk patients independently of their *BRAF* mutational status (score 0), whereas cases with TNM stage III and wild-type *BRAF* were classified into the intermediate-risk group (score 1) and patients with TNM stage III and *BRAF* mutation and those with TNM stage IV (with or without *BRAF* mutation), were considered to be high-risk (score 2). As could be expected, significantly different PFS rates were observed for cases with score 0 vs. score 1 vs. score 2: 2-year PFS of 91% vs. 77% vs. 0% respectively (p<0.0001) (Figure 2). Once the *BRAF* mutational status was excluded from the multivariate analyses, only TNM stage maintained statistically significance as an independent factor. Thus, no other plausible combinations were considered. Regarding OS, the TNM stage at diagnosis (p=0.02), the size of the tumor (p=0.005), and the microsatellite instability status (p=0.01) together with the *BRAF* mutational status (p=0.001), were the only individual parameters that showed an impact on patient outcome, the latter being the only variable with an independent impact on patient OS -p=0.022; HR of 4.4 (95% CI of 0.7-28)- (Table 5). However, post-hoc power estimation revealed limited power to detect additional statistically significant differences on survival analyses due to limited sample sizes (Supplementary Table 4).

Validation of the prognostic score in an independent series of sCRC patients

In order to confirm the prognostic impact of the proposed score described above, we investigated its prognostic impact in an independent series of sCRC patients from the public GEO database (n=533). These patients were classified according to TNM stage and *BRAF* mutational status at diagnosis into the three previously mentioned subgroups: score 0 (n=281), score 1 (n=130) and score 2 (n=80). PFS rates were very similar for cases with score 0 vs. score 1 vs. score 2: 2-year PFS of 90% vs. 75% vs. 48% respectively (p<0.0001) (Supplementary Figure 1). These results support previous findings in our dataset.

DISCUSSION

General consensus exists about the need to simultaneously assess multiple molecular markers for more accurate classification and personalized treatment of sCRC patients. In this study, we designed an NGS panel to investigate the frequency of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and

TP53 mutations and applied it to a series of 87 sCRC patients, to determine the potential impact of the mutations detected in patient outcome, and their association with the clinical and pathological features of the disease. Overall, our results showed a good performance of the NGS panel (and method) used and the feasibility of its use in routine diagnostics. Overall, the frequency and type of the distinct mutations identified was generally concordant with previous data from the literature [17–19]. In addition, we observed that from the 4 genes investigated; only the *BRAF* V600E mutation alone or together with the TNM stage at diagnosis had an independent prognostic impact both for patient OS and PFS respectively. Although other histopathological (e.g. tumor grade, perineural and lymphovascular invasion), clinical (e.g. age) and genetic (e.g. the microsatellite status) features of the disease also showed to be of potential prognostic value when individually considered, they lost their significance in the multivariate analysis.

The frequency and significance of *KRAS* mutations have been thoroughly investigated in sCRC patients, particularly in the context of anti-EGFR therapies [17, 20, 21]. Despite this, the prognostic impact of *KRAS* mutations in sCRC patients remains controversial. Thus, while some studies have found that exon 2 (codon 13) mutations predict for a worse prognosis including higher recurrence and shorter survival rates,[22] others highlighted the potential value of *KRAS* mutations in exons 3 and 4 (codons 61, 146 and 147) rather than in exon 2, as a predictive marker for PFS [23, 24] and OS [24, 25], and Palomba et al, did not find a significant prognostic impact for mutated *KRAS* in a large series of 1,284 CRC patients [26]. These apparently controversial results on the potential prognostic significance of *KRAS* mutations in sCRC, are probably due to the great genetic heterogeneity of this type of tumors, the effect of additional genetic markers and potentially also, differences in the series of patients analyzed [27]. In this regard, several studies have shown discrepancies in the *KRAS* mutational status of different tumoral samples from the same patient, and among distinct techniques. For example, Li *et al*, found a discordance rate of 19% in the frequency of *KRAS* mutations once studied by quantitative real-time PCR vs. MassARRAY[®] techniques, between primary tumors and their paired metastatic lesions in Chinese patients with sCRC [28]. In the present study, we found *KRAS* mutations in around one third of the patients, particularly among well differentiated tumors, localized in the right colon, in the absence of lymphovascular invasion, in line with previous observations [29–32]. However, in our series, *KRAS* mutated sCRC patients showed similar PFS and OS rates to wild-type *KRAS* cases.

Similarly, while some previous studies have reported an association among *NRAS*-mutated patients and a shorter OS [33], we could not confirm these findings in our series, due to the fact that only 1/87 patients investigated here

showed *NRAS* mutation, in line with previous studies [11]. Therefore, further studies in larger series of sCRC patients are required to establish the prognostic impact of *NRAS* mutations.

As expected, the overall frequency of *BRAF* mutations detected in our series was lower than that of *KRAS* [23, 26]. Interestingly, patients who carried *BRAF* mutations more frequently had poor-prognosis disease features such as poor-differentiated tumors [34], presence of peritoneal carcinomatosis [31, 35] and microsatellite instability, as also reported by others [32, 36]. In addition and in line with previous studies, half of the patients in our series with *BRAF* mutation were found in stage III [37]. Despite this, the *BRAF* mutation showed an independent adverse prognostic impact on both PFS and OS, as also pointed out previously by others [4, 23, 38, 39]. Further prospective studies in larger series of patients are required to confirm these observations.

TP53 gene mutations were detected in one third of our cases, a frequency that is in the lower range of that described previously by others [40, 41]. In line with previous observations, *TP53* mutations were associated with female gender [42], but showed no impact on patient PFS and OS. In this regard, previous studies on the potential association between *TP53* mutations and the prognosis of sCRC have yielded inconsistent results [43, 44] This might be due to insufficient statistical power (in our and also other series) to detect modest survival differences between wild-type and mutated *TP53* patients, the need for longer follow-up and the potential influence of adjuvant therapy. On top of this, it should be noted that the non-mutated *TP53* allele of the gene could be functional and counteract the mutated phenotype; thus, further studies are required to investigate the potential impact of *TP53* genetic alterations involving the other *TP53* gene -e.g. del(17p)- [45].

As far as the slightly lower mutation frequency detected in our series, particularly *KRAS*, and since the level of sensitivity achieved is good, we consider it could be attributed to intratumoral heterogeneity (ITH). Tumor biopsy represents a limited fraction of the tumoral clones, simply due to spatial ITH [46].

As expected, several clinical and biological variables showed a significant association with the outcome of sCRC patients. Thus, female gender, advanced disease stage at diagnosis, poorly-differentiated tumors and the presence of lymphovascular/perineural invasion at diagnostic surgery, together with the *BRAF* mutational status, were all associated with an adverse impact on PFS in the univariate analysis, in line with previous studies [45, 47–49]. In contrast, only the TNM stage at diagnosis, the tumor size, microsatellite instability and the *BRAF* status showed a prognostic impact on OS (in the univariate analysis) among our cases. Multivariate analysis of prognostic factors showed that the best combination of independent variables for predicting PFS

in sCRC patients were the presence of *BRAF* mutations and an advanced TNM stage at diagnosis, the former also retaining its independent prognostic value for OS. Based on these results, we built an original scoring system that allowed stratification of the sCRC patients analysed into three different risk groups with significantly different PFS rates at 2 years. Validation of this score in an independent dataset further strengthens this evidence. Of note, in this model, the *BRAF* mutational status specifically contributed to the sub-stratification of TNM stage III patients into intermediate vs. high-risk cases. Despite the fact that an association has been reported between the mutational status of genes of the *EGFR* signaling pathway and the prognosis of sCRC patients [38, 50–53], to the best of our knowledge, this is the first time that a scoring system based on combined assessment of the TNM stage at diagnosis and the *BRAF* mutational status is proposed, for the identification of sCRC patients undergoing complete tumor resection who are still at high risk of recurrence of the disease in the first 2-years after diagnosis (score 2). If the prognostic value of this new risk stratification model is confirmed in prospective series of sCRC patients it might contribute to pave the way for trials evaluating *BRAF*-targeted therapies in this specific subgroup of sCRC cases.

In summary, here we confirm the adverse prognosis of *BRAF* mutations in sCRC, and point out their utility, together with the TNM stage, for the identification, already at diagnosis, of a subgroup of sCRC patients (TNM stage IV plus TNM stage III and *BRAF* mutated patients) who, despite following complete resection of the tumor, still retain a high-risk of recurrence during the first two years after diagnosis. Additional prospective studies are required to confirm the utility of the proposed predictive model in larger series of homogeneously treated sCRC patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

Freshly-frozen sCRC tissues were obtained from primary tumors of 87 Caucasian patients diagnosed with sCRC, and classified according to the World Health Organization (WHO) criteria [54], after each patient gave his/her informed consent to participate in this study. All patients underwent surgical resection of primary tumor tissues at the Department of Surgery of the University Hospital of Salamanca (HUS; Salamanca, Spain) before they had received any treatment.

Histopathological diagnosis was established by an experienced pathologist, that ensured the selection of sections representative of the tumor tissue with >70% tumor cell infiltration for further genetic analyses. DNA was extracted and isolated from freshly-frozen primary sCRC tumor tissues, using a Maxwell® 16 System for Genomic DNA Extraction (Promega, Mannheim,

Germany) and quantified using a Qubit dsDNA BR assay (Life Technologies, Carlsbad CA). A positive control sample -Quantitative Multiplex DNA reference standard (Horizon Discovery, Cambridge, UK)- was analyzed in parallel to each set of samples, for validation of the custom panel designed, and evaluation of the specific sensitivity of each variant call.

The study was approved by the local ethics committee of the HUS.

Custom amplicon panel design

A custom amplicon panel for NGS analysis of the hotspot regions of *KRAS/NRAS* (exons 2, 3 and 4), and *BRAF* (exon 15), was designed; additionally, the whole *TP53* coding regions were also included in the panel for a total of 53 amplicons and 5,300bp, with an estimated coverage per sample of 7,000x.

Preparation of DNA libraries

DNA libraries were prepared with the Truseq Custom Amplicon Panel (Illumina, San Diego, CA), according to the manufacturer's protocol. Briefly, 50-250 ng of gDNA in 10 µl water was hybridized with a pool of oligonucleotides. Then, the unbound oligonucleotides were removed, and extension-ligation of the bound oligonucleotides was followed by PCR amplification. PCR products were cleaned and their quality checked using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A minimum size of the PCR product of ~275 bp was required. Then, the DNA libraries were then quantified using the Qubit dsDNA HS Assay Kit and the Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies). Subsequently, each DNA library was diluted to a concentration of 4 nM and pooled with the other libraries in aliquots of equal volumes. The amplicon DNA libraries were paired-end sequenced using a MiSeq (Illumina) instrument.

Analysis of DNA sequences

The sequence data generated were pre-processed with the MiSeq Reporter (MiSeq integrated software, Illumina), which uses a Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [55] and the Genome Analysis Tool Kit (GATK) [56] for variant calling of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and short insertions and deletions (InDels). The identified variants were exported in the VCF data file format for further analysis using the sequencer-accompanied software (Variant Studio, Illumina) and the Integrative Genomics Viewer (IGV) software (Broad Institute, Cambridge, MA). We employed the Illumina Variant studio population frequency filters (based on the www.1000genomes.org database) to exclude variants with an overall minor allele frequency greater than 1.0%, considered common SNPs, taking as reference the Caucasian population.

The following criteria were used to define and report a variant: minimum coverage of 100x, minimum variant frequency of 5%, confirmed by visual inspection using the Integrative Genomics Viewer 16 software. Detailed visual inspection with the IGV software was performed to confirm the presence and the read depth of the amplicons. Variant allele frequency (VAF) was established based on the number of reads called for the altered allele and the total number of reads called at that position by the Variant Studio Software (Illumina).

External validation of the proposed score

A prognostic score based on the TNM stage and BRAF mutational status is established. External validation of the proposed score was performed in a previously reported group of sCRC patients from which TNM stage and BRAF mutational status at diagnosis and follow-up data were publicly available at the GEO database (accession number GSE39582) [57]. Patients included in this external validation group showed mutated BRAF in 48/533 (9%) and were classified according to the TNM staging system as follows: 38 patients had stage I (7.1%), 248 had stage II (46.5%), 186 had stage III (34.9%) and 61 had stage IV (11.4%).

Statistical analyses

For all continuous variables, median and mean values and their standard deviation (SD) and range were calculated using the SPSS software package (SPSS 22.0 Inc, Chicago, IL); for dichotomic variables, frequencies were reported. In order to evaluate the statistical significance of differences observed between groups of mutated vs. non mutated patients, the Student's T and the Mann-Whitney U tests were used for continuous variables, depending on whether they displayed or not a normal distribution, respectively. For qualitative variables, the χ^2 test was applied (cross-tab; SPSS).

For survival analyses, patients i) who had sCRC tumors other than adenocarcinoma (n=7), ii) those who dies within the first 30 days after surgery (n=4), and/or iii) did not undergo R0 resection (n=2), were excluded from the study. PFS and OS curves were plotted for the remaining 74 patients according to the method of Kaplan and Meier, and the one-sided log-rank test (one-sided) was used to establish the statistical significance of differences observed between survival curves (survival; SPSS). Multivariate analysis of prognostic factors for PFS and OS was performed using the Cox stepwise regression (forward selection) model (regression, SPSS). For multivariate analysis, only those variables showing a statistically significant association with PFS or OS in the univariate analysis, were considered. Due to the limited sample size, post-hoc power estimation was performed for all association and survival analyses and a power estimation

of <0.8 was considered to be inadequate. Statistical significance was set at p values < 0.05.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

FUNDING

This work has been partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain) (PI12/02053-FIS), Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, Valladolid, Spain (GRS1302/A/16), Consejería de Sanidad (Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain) (BIO/SA46/14, BIO/SA02/13), RTICC from the ISCIII (RD12/0020/0035-FEDER, RD12/0036/0048-FEDER) and CIBERONC (CB16/12/00400 and CB16/12/00233), Fundación Memoria de Don Samuel Solórzano Barruso, (Salamanca, Spain) and Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, (Madrid, Spain). JM Sayagués and ME Sarasquete are supported by grants (CES11/004 and CP13/00080) from the ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65:5–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>.
2. 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:E359–86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
3. Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, Siena S, Zhang K, Williams R, Wiezorek J. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol*. 2013; 31:759–65. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.1492>.
4. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, Stintzing S, Graeven U, Arnold D, von Weikersthal LF, Giessen-Jung C, Stahler A, Schmoll HJ, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol*. 2016; 27:1746–53. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw261>.
5. Shen Y, Han X, Wang J, Wang S, Yang H, Lu SH, Shi Y. Prognostic impact of mutation profiling in patients with stage II and III colon cancer. *Sci Rep*. 2016; 6:24310. <https://doi.org/10.1038/srep24310>.
6. Lo Nigro C, Ricci V, Vivenza D, Granetto C, Fabozzi T, Miraglio E, Merlano MC. Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. *World J Gastroenterol*. 2016; 22:6944–54. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6944>.
7. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12:594–603. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70209-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70209-6).
8. Safaee Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, Saeedi A, Li G. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012; 7:e47054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047054>.
9. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361:98–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0904160>.
10. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, Agarwal A, Maru DM, Sieber O, Desai J. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011; 117:4623–32. <https://doi.org/10.1002/cncr.26086>.
11. Irahara N, Baba Y, Noshio K, Shima K, Yan L, Dias-Santagata D, Iafrate AJ, Fuchs CS, Haigis KM, Ogino S. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2010; 19:157–63. <https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e3181c93fd1>.
12. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010; 11:753–62. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70130-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70130-3).
13. Malapelle U, Vigliar E, Sgariglia R, Bellocicene C, Colarossi L, Vitale D, Pallante P, Troncone G. Ion Torrent next-generation sequencing for routine identification of clinically relevant mutations in colorectal cancer patients. *J Clin Pathol*. 2015; 68:64–68. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202691>.
14. Mehrvarz Sarshekeh A, Advani S, Overman MJ, Manyam G, Kee BK, Fogelman DR, Dasari A, Raghav K, Vilar E, Manuel S, Shureiqi I, Wolff RA, Patel KP, et al. Association of SMAD4 mutation with patient demographics, tumor characteristics, and clinical outcomes in colorectal cancer. *PLoS One*. 2017; 12:e0173345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173345>.
15. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Di Nicolantonio F, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal

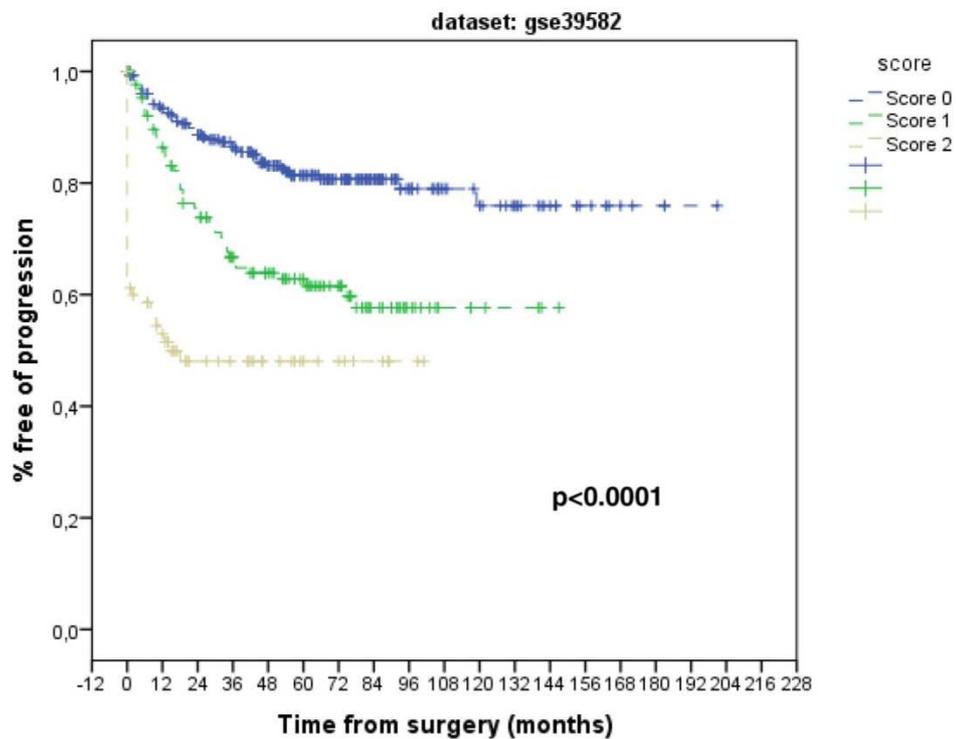
- antibodies. *Cancer Res.* 2009; 69:1851–57. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2466>.
16. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, Lambrechts D, Van Cutsem E, Tejpar S. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:3184–88. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2961>.
 17. Yu J, Wu WK, Li X, He J, Li XX, Ng SS, Yu C, Gao Z, Yang J, Li M, Wang Q, Liang Q, Pan Y, et al. Novel recurrently mutated genes and a prognostic mutation signature in colorectal cancer. *Gut.* 2015; 64:636–45. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306620>.
 18. Deschoolmeester V, Boeckx C, Baay M, Weyler J, Wuyts W, Van Marck E, Peeters M, Lardon F, Vermorken JB. KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *Br J Cancer.* 2010; 103:1627–36. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605959>.
 19. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Ruffe A, Foerster A, Frattini M, Terracciano L, Heinimann K, Lugli A. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010; 127:2569–75. <https://doi.org/10.1002/ijc.25265>.
 20. Dallol A, Buhmeida A, Al-Ahwal MS, Al-Maghrabi J, Bajouh O, Al-Khayyat S, Alam R, Abusanad A, Turki R, Elaimi A, Alhadrami HA, Abuzenadah M, Banni H, et al. Clinical significance of frequent somatic mutations detected by high-throughput targeted sequencing in archived colorectal cancer samples. *J Transl Med.* 2016; 14:118. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0878-9>.
 21. Al-Shamsi HO, Jones J, Fahmawi Y, Dahbour I, Tabash A, Abdel-Wahab R, Abousamra AO, Shaw KR, Xiao L, Hassan MM, Kipp BR, Kopetz S, Soliman AS, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, TP53, and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: determination of frequency and distribution pattern. *J Gastrointest Oncol.* 2016; 7:882–902. <https://doi.org/10.21037/jgo.2016.11.02>.
 22. Aldiab A, Al Khayal KA, Al Obaid OA, Alsheikh A, Alsaleh K, Shahid M, Alkharji H. Clinicopathological Features and Predictive Factors for Colorectal Cancer Outcome in the Kingdom of Saudi Arabia. *Oncology.* 2017; 92:75–86. <https://doi.org/10.1159/000450857>.
 23. Therkildsen C, Bergmann TK, Henriksen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* 2014; 53:852–64. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2014.895036>.
 24. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D, Masi G, Graziano F, Cremolini C, Rulli E, Canestrari E, Funel N, Schiavon G, et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27:2622–29. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.2796>.
 25. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocáková I, Ruff P, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013; 369:1023–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1305275>.
 26. Palomba G, Doneddu V, Cossu A, Paliogiannis P, Manca A, Casula M, Colombino M, Lanzillo A, Defraia E, Pazzola A, Sanna G, Putzu C, Ortu S, et al. Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study. *J Transl Med.* 2016; 14:292. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1053-z>.
 27. Foltran L, De Maglio G, Pella N, Ermacora P, Aprile G, Masiero E, Giovannoni M, Iaiza E, Cardellino GG, Lutrino SE, Mazzer M, Giangreco M, Pisa FE, et al. Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer. *Future Oncol.* 2015; 11:629–40. <https://doi.org/10.2217/fon.14.279>.
 28. Li ZZ, Bai L, Wang F, Zhang ZC, Wang F, Zeng ZL, Zeng JB, Zhang DS, Wang FH, Wang ZQ, Li YH, Shao JY, Xu RH. Comparison of KRAS mutation status between primary tumor and metastasis in Chinese colorectal cancer patients. *Med Oncol.* 2016; 33:71. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0787-z>.
 29. Kawabata Y, Tomita N, Monden T, Ohue M, Ohnishi T, Sasaki M, Sekimoto M, Sakita I, Tamaki Y, Takahashi J, Yagyu T, Mishima H, Kikkawa N, Monden M. Molecular characteristics of poorly differentiated adenocarcinoma and signet-ring-cell carcinoma of colorectum. *Int J Cancer.* 1999; 84:33–38. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990219\)84:13.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990219)84:13.0.CO;2-Z).
 30. Summers MG, Smith CG, Maughan TS, Kaplan R, Escott-Price V, Cheadle JP. BRAF and NRAS Locus-Specific Variants Have Different Outcomes on Survival to Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017; 23:2742–49. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1541>.
 31. Li ZZ, Wang F, Zhang ZC, Wang F, Zhao Q, Zhang DS, Wang FH, Wang ZQ, Luo HY, He MM, Wang DS, Jin Y, Ren C, et al. Mutation profiling in chinese patients with metastatic colorectal cancer and its correlation with clinicopathological features and anti-EGFR treatment response. *Oncotarget.* 2016; 7:28356–68. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8541>.
 32. Eklöf V, Wikberg ML, Edin S, Dahlin AM, Jonsson BA, Öberg Å, Rutegård J, Palmqvist R. The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2013; 108:2153–63. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.212>.

33. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, Salvatore L, Antoniotti C, Marmorino F, Sensi E, Lupi C, Fontanini G, De Gregorio V, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2015; 136:83–90. <https://doi.org/10.1002/ijc.28955>.
34. Olevian DC, Nikiforova MN, Chiosea S, Sun W, Bahary N, Kuan SF, Pai RK. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. *Hum Pathol*. 2016; 49:124–34. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.11.004>.
35. Yaeger R, Cercek A, Chou JF, Sylvester BE, Kemeny NE, Hechtman JF, Ladanyi M, Rosen N, Weiser MR, Capanu M, Solit DB, D'Angelica MI, Vakiani E, Saltz LB. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2014; 120:2316–24. <https://doi.org/10.1002/cncr.28729>.
36. Nakaji Y, Oki E, Nakanishi R, Ando K, Sugiyama M, Nakashima Y, Yamashita N, Sacki H, Oda Y, Maehara Y. Prognostic value of BRAF V600E mutation and microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017; 143:151–60. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2275-4>.
37. Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, McCleary NJ, Ng K, Hollis D, Saltz LB, Mayer RJ, Schaefer P, Whittom R, Hantel A, Benson AB 3rd, Spiegelman D, et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:890–900. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2246>.
38. Seligmann JF, Fisher D, Smith CG, Richman SD, Elliott F, Brown S, Adams R, Maughan T, Quirke P, Cheadle J, Seymour M, Middleton G. Investigating the poor outcomes of BRAF-mutant advanced colorectal cancer: analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Ann Oncol*. 2017; 28:562–68. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw645>.
39. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Walters RJ, Pearson S, Pavluk E, Nagler B, Pakenas D, Jass JR, Jenkins MA, Win AK, Southey MC, et al. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. *Mod Pathol*. 2013; 26:825–34. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.240>.
40. Chang SC, Lin PC, Lin JK, Lin CH, Yang SH, Liang WY, Chen WS, Jiang JK. Mutation Spectra of Common Cancer-Associated Genes in Different Phenotypes of Colorectal Carcinoma Without Distant Metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2016; 23:849–55. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4899-z>.
41. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Leonardi E, Truini M, Malacarne D, Castagnola P, Giaretti W. KRAS, p53 and BRAF gene mutations and aneuploidy in sporadic colorectal cancer progression. *Cell Oncol*. 2006; 28:161–66.
42. Cai ZX, Tang XD, Gao HL, Tang C, Nandakumar V, Jones L, Ye H, Lou F, Zhang D, Sun H, Dong H, Zhang G, Liu Z, et al. APC, FBXW7, KRAS, PIK3CA, and TP53 gene mutation in human Colorectal Cancer Tumor Frequently Detected by Next-Generation DNA Sequencing. *J Mol Genet Med*. 2014; 8. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000145>.
43. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer*. 2005; 92:434–44. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602358>.
44. Tang R, Wang JY, Fan CW, Tsao KC, Chen HH, Wu CM, Chen JS, Changchien CR, Hsieh LL. p53 is an independent pre-treatment markers for long-term survival in stage II and III colorectal cancers: an analysis of interaction between genetic markers and fluorouracil-based adjuvant therapy. *Cancer Lett*. 2004; 210:101–09. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.01.006>.
45. González-González M, Muñoz-Bellvis L, Mackintosh C, Fontanillo C, Gutiérrez ML, Abad MM, Bengoechea O, Teodosio C, Fonseca E, Fuentes M, De Las Rivas J, Orfao A, Sayagués JM. Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as assessed by interphase FISH in sporadic colorectal carcinomas. *PLoS One*. 2012; 7:e42683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042683>.
46. Árnadóttir SS, Jeppesen M, Lamy P, Bramsen JB, Nordentoft I, Knudsen M, Vang S, Madsen MR, Thastrup O, Thastrup J, L Andersen C. Characterization of genetic intratumor heterogeneity in colorectal cancer and matching patient-derived spheroid cultures. *Mol Oncol*. 2018; 12:132–47. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12156>.
47. Zhou Y, Wang H, Gong H, Cao M, Zhang G, Wang Y. Clinical significance of perineural invasion in stages II and III colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2015; 211:839–44. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.09.001>.
48. Das V, Kalita J, Pal M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed Pharmacother*. 2017; 87:8–19. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.064>.
49. Dienstmann R, Mason MJ, Sinicrope FA, Phipps AI, Tejpar S, Nesbakken A, Danielsen SA, Sveen A, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, Bot B, Alberts SR, et al. Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: a retrospective, pooled biomarker study. *Ann Oncol*. 2017; 28:1023–31. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx052>.
50. Álgars A, Sundström J, Lintunen M, Jokilehto T, Kytölä S, Kaare M, Vainionpää R, Orpana A, Österlund P, Ristimäki A, Carpen O, Ristimäki R. EGFR gene copy number predicts response to anti-EGFR treatment in RAS wild type and RAS/BRAF/PIK3CA wild type metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2017; 140:922–29. <https://doi.org/10.1002/ijc.30507>.
51. Sugai T, Eizuka M, Takahashi Y, Fukagawa T, Habano W, Yamamoto E, Akasaka R, Otuska K, Matsumoto T, Suzuki H. Molecular subtypes of colorectal cancers determined by

Combined assessment of the TNM stage and *BRAF* mutational status at diagnosis in sporadic colorectal cancer patients

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Progression free survival of gse39582 dataset patients according to proposed score



Supplementary Figure 1: Progression free survival plot of external dataset (GSE39582) of patients according to our proposed score.

Supplementary Table 1: Number of reads of each amplicon per patient.

amplicon	GENE	REF SAMPLE	P1	P2	P3	P4	P5
1	BRAF1	2191	1426	1493	2923	1999	1791
2	BRAF2	6650	6430	5251	9508	7817	6559
3	NRAS1	2401	3376	2965	4866	3525	3589
4	NRAS2	2331	3346	2652	5153	3450	3802
5	NRAS3	2232	3808	3508	5225	4095	3950
6	NRAS4	860	2377	2	2167	453	402
7	NRAS5	2048	3282	2640	4834	3563	3566
8	KRAS1	1934	4969	3556	4650	4058	3575
9	KRAS2	1170	2186	1424	2102	1627	1530
10	KRAS3	1141	3207	2257	3727	2988	2019
11	KRAS4	1889	3958	3270	5175	4246	3856
12	KRAS5	1815	3420	2893	3183	2866	2520
13	KRAS6	1805	3725	3108	4468	3688	3582
14	KRAS7	1591	4454	3761	4869	4026	3442
15	TP53_1	4356	5571	4591	5867	7534	8304
16	TP53_2	1431	2354	2352	1873	2686	2500
17	TP53_3	579	574	933	331	1013	647
18	TP53_4	694	1770	1930	1192	1724	1798
19	TP53_5	1516	1868	1616	1018	1236	1292
20	TP53_6	1256	1627	1707	1508	1810	1561
21	TP53_7	1483	2679	2670	1893	2078	2024
22	TP53_8	134	105	164	107	94	85
23	TP53_9	2848	2777	2572	2630	3152	3330
24	TP53_10	1054	1857	1482	2432	2850	3264
25	TP53_11	3022	6132	5571	5400	6586	6713
26	TP53_12	270	354	397	219	335	431
27	TP53_13	3964	3904	5045	3550	4501	4604
28	TP53_14	8568	9160	8284	8853	11097	12280
29	TP53_15	4950	6355	5776	5046	6404	6452
30	TP53_16	207	166	263	107	131	146
31	TP53_17	4482	4242	4231	4486	5878	6107
32	TP53_18	1989	2803	2531	1870	2089	2
33	TP53_19	3901	5311	4864	5696	7444	8569
34	TP53_20	3269	5020	4891	4525	6351	7514
35	TP53_21	2087	3090	3356	2651	3378	3964
36	TP53_22	65	88	144	58	82	87
37	TP53_23	3592	5438	5123	4707	6530	7036
38	TP53_24	2118	3603	3019	3568	4829	5341
39	TP53_25	2880	3757	3334	2967	4067	3822
40	TP53_26	763	1062	1183	633	916	976
41	TP53_27	317	299	234	145	392	197
42	TP53_28	477	1155	1210	926	1427	1204
43	TP53_29	64	113	216	75	78	119
44	TP53_30	95	162	224	114	150	180
45	TP53_31	1284	1479	1578	1746	2143	2452
46	TP53_32	4858	5987	4664	4972	6202	6790
47	TP53_33	1593	2139	2190	1524	1811	2068
48	TP53_34	2384	3631	3467	3904	4664	5093
49	TP53_35	1793	2121	2047	2578	3674	4092
50	TP53_36	3653	4711	4881	4266	5611	6335
51	TP53_37	6043	8124	6720	6581	7833	8661
52	TP53_38	41	114	71	136	175	178
53	TP53_39	3869	4057	3478	3952	5135	5779

amplicon	GENE	P6	P7	P8	P9	P10	P11
1	BRAF1	2239	2091	1253	2186	1852	1941
2	BRAF2	7467	8872	6999	7031	5745	7452
3	NRAS1	3818	3771	3905	3380	3483	3243
4	NRAS2	4115	3714	3875	3800	4049	3819
5	NRAS3	4731	4235	4661	2774	3405	3064
6	NRAS4	2187	13	734	2183	417	479
7	NRAS5	3745	3311	2727	3055	3450	2965
8	KRAS1	5036	4515	2694	2465	2742	3114
9	KRAS2	2087	1691	836	1061	1381	1595
10	KRAS3	3788	1929	2038	1649	2093	1535
11	KRAS4	5278	4742	4018	2859	3053	2919
12	KRAS5	3612	3426	2253	1971	2130	2457
13	KRAS6	4739	3804	3029	2228	1369	2518
14	KRAS7	5144	4334	3193	2259	2390	2910
15	TP53_1	5949	7228	8883	5890	6690	5092
16	TP53_2	2349	2247	2344	1415	1759	1713
17	TP53_3	435	470	1207	343	416	454
18	TP53_4	1533	1753	2085	1172	1395	1207
19	TP53_5	993	1193	924	770	1219	1130
20	TP53_6	1255	1764	2015	1461	1476	1434
21	TP53_7	1765	2350	2198	1421	1705	1702
22	TP53_8	54	156	175	120	86	75
23	TP53_9	2591	2843	2079	2130	2593	2339
24	TP53_10	2155	2585	2207	2077	2601	1701
25	TP53_11	5472	5917	6200	4189	5368	4517
26	TP53_12	285	328	459	228	320	236
27	TP53_13	3502	4027	5343	4155	4145	3085
28	TP53_14	8272	10582	13473	8121	9620	7845
29	TP53_15	5152	6412	6792	4703	5458	4526
30	TP53_16	106	144	177	97	156	104
31	TP53_17	4382	5492	7168	4557	5329	4000
32	TP53_18	1965	1877	2679	1777	1054	1458
33	TP53_19	6030	7323	9080	4624	5950	4828
34	TP53_20	5003	5672	8147	3049	4602	3645
35	TP53_21	2659	3621	4461	2457	3061	2609
36	TP53_22	54	49	135	72	62	62
37	TP53_23	5170	6335	6942	4021	4746	3902
38	TP53_24	3791	4320	5433	2253	3105	2619
39	TP53_25	3008	3803	4473	2759	3059	2910
40	TP53_26	694	814	766	454	703	732
41	TP53_27	272	360	378	283	137	133
42	TP53_28	947	1337	1368	733	790	886
43	TP53_29	50	88	98	95	118	89
44	TP53_30	76	157	255	105	136	101
45	TP53_31	1685	1780	2440	1303	1586	1295
46	TP53_32	5059	5629	5690	4104	5148	4423
47	TP53_33	1479	1813	2082	1543	1856	1800
48	TP53_34	3717	4436	5257	2557	3457	2851
49	TP53_35	2808	3485	4290	2066	2657	1927
50	TP53_36	4744	5326	6921	3715	4413	3810
51	TP53_37	6489	7210	6979	5054	6754	6068
52	TP53_38	160	137	197	118	107	85
53	TP53_39	4195	4377	6608	4033	4479	4532

amplicon	GENE	P12	P13	P14	P15	P16	P17
1	BRAF1	2065	2039	1641	2278	3088	2461
2	BRAF2	8094	7670	5560	8090	7845	9133
3	NRAS1	3850	3969	3202	3195	3766	7565
4	NRAS2	3719	3999	2996	3662	4503	4625
5	NRAS3	3570	4163	3175	2971	3874	4470
6	NRAS4	1656	1698	531	1153	2726	1342
7	NRAS5	3163	3652	3050	3132	4357	4694
8	KRAS1	2472	4401	2692	3066	4692	4832
9	KRAS2	1086	2210	1484	1608	3648	2188
10	KRAS3	1726	1703	2208	1435	3123	2809
11	KRAS4	3223	4478	3225	3899	3546	5258
12	KRAS5	1988	3044	2631	2338	2990	4364
13	KRAS6	3088	4056	3324	3556	4409	5571
14	KRAS7	2261	3227	2670	2882	3195	5188
15	TP53_1	6257	7733	6652	7000	5408	11765
16	TP53_2	1674	2073	1898	1827	2260	3846
17	TP53_3	439	470	463	1119	832	995
18	TP53_4	1033	1572	1190	1427	2099	2676
19	TP53_5	867	1368	1186	1077	1791	2937
20	TP53_6	1397	1873	1334	1236	1824	2863
21	TP53_7	1303	1800	1791	1479	2856	3649
22	TP53_8	100	94	126	100	162	227
23	TP53_9	2136	3537	2810	2968	4018	6093
24	TP53_10	2286	2762	2378	2476	3030	4765
25	TP53_11	3502	5117	4149	4966	6058	11524
26	TP53_12	230	336	226	326	394	589
27	TP53_13	3369	4277	4305	4582	6019	10125
28	TP53_14	7763	9841	8650	8977	10611	18942
29	TP53_15	4565	6515	5512	5228	7475	11852
30	TP53_16	81	132	145	131	423	319
31	TP53_17	5044	6059	4837	5251	6012	11153
32	TP53_18	1337	2595	1972	2197	2816	5710
33	TP53_19	5552	6293	5604	5382	5034	11534
34	TP53_20	4373	4812	3945	4154	4057	9837
35	TP53_21	2366	3446	2711	3268	3913	6438
36	TP53_22	66	66	77	87	98	202
37	TP53_23	4109	4903	3611	4396	5552	6781
38	TP53_24	2984	3537	2457	2856	2720	4360
39	TP53_25	2535	3294	2979	2884	3787	6851
40	TP53_26	515	841	674	602	1615	1800
41	TP53_27	295	188	199	229	444	443
42	TP53_28	887	1052	912	878	1519	1933
43	TP53_29	65	163	157	105	121	270
44	TP53_30	81	141	186	120	110	503
45	TP53_31	1526	1890	1359	1425	2103	3082
46	TP53_32	4464	5935	4976	4716	7823	11774
47	TP53_33	1205	1864	1408	1687	3639	3995
48	TP53_34	3046	3797	3181	3230	3667	7022
49	TP53_35	2668	2934	2218	2191	2732	4602
50	TP53_36	3747	4822	4023	3958	4752	9434
51	TP53_37	5407	7723	6753	6401	8970	14755
52	TP53_38	138	135	135	125	224	196
53	TP53_39	3770	4331	3890	4254	3283	7678

amplicon	GENE	P18	P19	P20	P21	P22	P23
1	BRAF1	1807	2443	2119	1985	2086	5253
2	BRAF2	5673	6737	8384	7627	6209	17165
3	NRAS1	3722	3755	4733	4389	3763	5956
4	NRAS2	3788	3832	4558	4577	4268	5620
5	NRAS3	3346	3269	4229	4507	3543	5039
6	NRAS4	513	581	701	1984	1779	463
7	NRAS5	3450	3266	4208	4296	3533	5219
8	KRAS1	2565	3021	3978	4193	3619	5490
9	KRAS2	1388	1598	1992	2088	1874	3299
10	KRAS3	1653	1327	2474	3003	2513	3969
11	KRAS4	2657	3387	3962	3966	3288	5734
12	KRAS5	2637	2116	2938	3085	2643	4427
13	KRAS6	3351	2962	3514	3983	3289	5779
14	KRAS7	3013	2844	3526	3611	2795	5119
15	TP53_1	5489	5363	7115	7293	6428	8110
16	TP53_2	2083	1930	2450	2418	2205	3006
17	TP53_3	574	427	568	519	575	741
18	TP53_4	1537	1258	1673	1673	1656	2452
19	TP53_5	1683	1127	1484	1737	1432	1944
20	TP53_6	1360	1609	1893	1846	1820	1876
21	TP53_7	1906	1596	2301	2095	2098	2603
22	TP53_8	100	116	134	139	123	115
23	TP53_9	3662	2786	3801	4073	3266	4683
24	TP53_10	2757	2262	2972	3302	2732	4017
25	TP53_11	5859	5116	6560	7263	6178	8079
26	TP53_12	360	265	280	392	293	433
27	TP53_13	5648	4147	5351	5338	5378	7113
28	TP53_14	10069	7692	10481	11470	9396	12957
29	TP53_15	6149	5240	7441	7420	7061	9176
30	TP53_16	177	104	166	181	153	258
31	TP53_17	5732	4378	6329	6520	5480	7128
32	TP53_18	2566	2191	2633	3023	2761	3374
33	TP53_19	5967	4926	6498	7198	6050	7393
34	TP53_20	4860	3817	5342	5767	4727	6244
35	TP53_21	3298	2836	3572	3834	3616	4821
36	TP53_22	66	72	87	102	96	136
37	TP53_23	3908	4368	5601	5907	5178	6676
38	TP53_24	2436	2734	3423	3897	2741	3690
39	TP53_25	3454	2735	3856	3717	3286	4541
40	TP53_26	1079	768	1021	1436	982	1323
41	TP53_27	174	206	174	361	290	421
42	TP53_28	1204	854	993	1311	1041	1360
43	TP53_29	177	77	110	106	99	139
44	TP53_30	230	105	137	224	129	166
45	TP53_31	1576	1389	1829	2001	1771	2381
46	TP53_32	5962	4965	6779	7432	6758	8573
47	TP53_33	2178	1997	2275	2245	2345	3055
48	TP53_34	3633	3261	4352	4791	4154	5208
49	TP53_35	2493	2223	3089	3372	2703	3391
50	TP53_36	4713	4123	5541	5970	5445	6882
51	TP53_37	7981	6584	8864	9235	8456	10566
52	TP53_38	123	116	137	153	121	173
53	TP53_39	3891	3328	4645	4880	4143	5139

amplicon	GENE	P24	P25	P26	P27	P28	P29
1	BRAF1	1590	2439	1868	2609	3195	2713
2	BRAF2	8159	8630	7686	9342	13987	9792
3	NRAS1	3855	4301	5169	5341	6135	4071
4	NRAS2	3997	4342	5095	4025	6061	5139
5	NRAS3	3460	3885	3923	3664	5695	4343
6	NRAS4	1615	3663	218	198	2912	2445
7	NRAS5	2917	3422	3634	2927	4921	3673
8	KRAS1	4047	3424	4160	3331	5167	4453
9	KRAS2	1738	1697	2289	1573	2416	2330
10	KRAS3	2979	2379	3124	2162	2503	3382
11	KRAS4	3716	2810	3839	3120	4492	3934
12	KRAS5	3290	2508	2967	2965	4215	3239
13	KRAS6	3295	3332	4236	3905	4738	4510
14	KRAS7	3381	2837	3392	3098	3885	3441
15	TP53_1	6980	6692	8357	7786	11938	8133
16	TP53_2	1926	2299	3023	2632	3342	2787
17	TP53_3	703	1500	1675	886	984	2769
18	TP53_4	1849	2334	2262	2191	2765	2411
19	TP53_5	1125	1470	1496	1728	1993	1693
20	TP53_6	1658	1778	1706	1795	3076	1651
21	TP53_7	2852	2032	2502	2825	4242	2407
22	TP53_8	164	117	101	198	297	131
23	TP53_9	2144	3260	3701	3406	4349	3476
24	TP53_10	2202	3040	2975	2819	4460	2921
25	TP53_11	4371	6065	6822	6094	8696	6179
26	TP53_12	300	455	435	359	608	419
27	TP53_13	4265	5743	5596	5597	6796	5767
28	TP53_14	10876	12790	14239	11819	17915	12874
29	TP53_15	7545	9270	9627	7551	12758	9318
30	TP53_16	198	160	262	174	302	274
31	TP53_17	5917	7079	7404	6991	9755	7904
32	TP53_18	2553	2609	3091	2360	3872	3440
33	TP53_19	6987	7859	9687	7927	12054	8407
34	TP53_20	4986	5996	6033	6087	8688	5701
35	TP53_21	3904	4029	5009	4253	6637	4773
36	TP53_22	95	172	181	73	144	155
37	TP53_23	5891	6970	7725	6233	9301	7110
38	TP53_24	2552	3503	3716	3447	4897	3784
39	TP53_25	2807	3113	3749	3623	5546	3639
40	TP53_26	1216	1630	1656	1542	2138	1831
41	TP53_27	249	412	256	431	696	462
42	TP53_28	933	1474	1606	1406	2025	1492
43	TP53_29	235	233	258	183	237	212
44	TP53_30	198	100	121	103	177	111
45	TP53_31	1624	1870	2023	1903	2617	2112
46	TP53_32	6445	7638	9268	8072	11021	8885
47	TP53_33	1665	2602	2701	2517	3262	2785
48	TP53_34	2704	3522	4334	3625	5271	3639
49	TP53_35	3399	3295	4076	3465	5390	3601
50	TP53_36	5555	6746	7381	6515	10483	7187
51	TP53_37	7632	9817	10693	9369	13596	10225
52	TP53_38	191	189	184	165	290	240
53	TP53_39	4017	4573	4833	4603	6709	4500

amplicon	GENE	P30	P31	P32	P33	P34	P35
1	BRAF1	3576	2702	3608	2223	2341	2378
2	BRAF2	13015	10588	11062	6591	8804	7510
3	NRAS1	5992	2840	4756	3035	5033	5191
4	NRAS2	5758	3267	5589	3857	4777	5063
5	NRAS3	5360	2302	4345	2525	4409	4653
6	NRAS4	221	2134	106	2127	2358	2076
7	NRAS5	4529	3142	3719	2255	3664	3634
8	KRAS1	4902	2303	3608	2822	4394	4192
9	KRAS2	2519	1308	1877	1522	2377	2015
10	KRAS3	3522	1825	2405	1558	1946	2968
11	KRAS4	3744	2987	2963	2788	3727	3693
12	KRAS5	3247	1541	2866	2367	3559	2689
13	KRAS6	4616	3793	4064	3024	4056	4210
14	KRAS7	3692	1474	2943	2602	3134	3184
15	TP53_1	7926	6445	5306	5922	7372	9122
16	TP53_2	2992	1827	1500	1974	2247	2427
17	TP53_3	1439	348	500	702	779	1938
18	TP53_4	2471	910	1158	1244	1850	2422
19	TP53_5	1477	478	862	1109	1664	1812
20	TP53_6	1887	1258	1243	1232	1911	1729
21	TP53_7	2757	1233	1713	2118	2518	2259
22	TP53_8	206	115	151	106	129	77
23	TP53_9	3782	2107	2072	2462	3196	3812
24	TP53_10	3077	2410	1907	1957	2532	3211
25	TP53_11	6774	3759	3538	3816	5102	6224
26	TP53_12	523	248	198	202	256	356
27	TP53_13	6012	4160	3743	3863	4791	6229
28	TP53_14	13093	9572	8073	10785	11727	14383
29	TP53_15	9368	4849	5442	5954	8320	9960
30	TP53_16	247	105	174	136	269	291
31	TP53_17	6757	4939	5284	5360	7046	8532
32	TP53_18	3217	1198	1778	2177	2927	1950
33	TP53_19	8574	5980	4847	5750	7117	8780
34	TP53_20	6038	5165	3519	3574	5152	5884
35	TP53_21	4707	2783	2483	2911	3982	4774
36	TP53_22	115	89	112	72	128	148
37	TP53_23	7344	4865	4187	4404	5319	6930
38	TP53_24	3608	2174	2100	2111	2921	4042
39	TP53_25	3839	1825	2354	2806	3415	4056
40	TP53_26	1827	783	832	1106	1589	1894
41	TP53_27	363	174	200	340	233	315
42	TP53_28	1583	764	483	970	1211	1516
43	TP53_29	205	71	146	173	218	167
44	TP53_30	132	103	73	86	87	170
45	TP53_31	2135	1375	990	1173	1782	2214
46	TP53_32	9280	4726	4931	5658	7803	9325
47	TP53_33	2789	1484	1697	2281	2405	3114
48	TP53_34	4010	2739	2369	2569	3329	4002
49	TP53_35	3769	3959	2382	2296	2840	3939
50	TP53_36	7524	4305	3585	4532	6240	7232
51	TP53_37	10013	6100	5683	6664	9067	10339
52	TP53_38	159	207	120	98	134	212
53	TP53_39	4783	3324	3059	4490	3967	5230

amplicon	GENE	P36	P37	P38	P39	P40	P41
1	BRAF1	1393	2689	3186	2695	2836	3191
2	BRAF2	5552	8991	11483	11249	9208	9608
3	NRAS1	5971	5247	6763	4939	6194	5843
4	NRAS2	5205	5482	6124	2400	5920	6494
5	NRAS3	4779	4730	5444	2454	6223	5501
6	NRAS4	2184	2216	58	1	108	103
7	NRAS5	3696	4445	4473	1998	4452	4344
8	KRAS1	2988	4179	6414	4149	6125	6107
9	KRAS2	1540	2260	2954	1833	3859	3394
10	KRAS3	2585	2941	1898	2930	4006	4224
11	KRAS4	2826	3597	5194	3626	4165	4782
12	KRAS5	3273	3122	4247	3015	4010	3953
13	KRAS6	4240	4777	6719	2016	5881	5572
14	KRAS7	3110	3225	4448	3541	5369	5470
15	TP53_1	9780	8798	13466	9177	6529	7698
16	TP53_2	2697	2507	3956	3220	2994	2896
17	TP53_3	2264	1632	2958	905	1663	1644
18	TP53_4	2689	2389	2844	2049	3362	3369
19	TP53_5	2349	2072	576	1818	2913	2630
20	TP53_6	2111	1936	2136	2334	3012	2961
21	TP53_7	3281	2816	2854	2991	4559	3802
22	TP53_8	170	154	137	234	199	180
23	TP53_9	4253	3683	4817	3510	5130	4717
24	TP53_10	3671	3352	4486	3318	3505	3608
25	TP53_11	7044	6285	7692	7783	9105	8740
26	TP53_12	544	437	599	563	591	521
27	TP53_13	6377	6620	8819	6430	7410	7581
28	TP53_14	16427	14089	20554	15355	14185	14558
29	TP53_15	11194	9517	12607	9340	11241	10900
30	TP53_16	432	363	320	174	681	659
31	TP53_17	9914	8257	12461	9958	8285	8642
32	TP53_18	4430	3687	4396	3216	3858	2244
33	TP53_19	10781	8056	12484	9226	6918	7438
34	TP53_20	7450	5860	8819	8117	5582	6766
35	TP53_21	6381	4908	6199	5115	4610	5451
36	TP53_22	265	140	129	161	251	275
37	TP53_23	6829	6558	9886	6514	8751	8726
38	TP53_24	3431	3524	5096	3824	4223	4207
39	TP53_25	5146	3999	5646	4057	5007	4673
40	TP53_26	2492	1875	2169	1762	2829	2395
41	TP53_27	243	297	599	201	879	727
42	TP53_28	1911	1380	1992	1582	2249	1907
43	TP53_29	451	262	234	219	319	276
44	TP53_30	330	133	124	231	113	134
45	TP53_31	2009	2116	2737	2300	2373	2645
46	TP53_32	10083	9020	11543	9263	10700	11013
47	TP53_33	3492	3127	3444	2814	4694	4138
48	TP53_34	4386	3901	5575	4192	4635	4584
49	TP53_35	4306	3284	5723	4572	3197	3326
50	TP53_36	8188	6298	9338	7546	7488	7475
51	TP53_37	12429	10769	14009	11446	12086	12130
52	TP53_38	260	188	292	154	382	310
53	TP53_39	5826	4872	7664	5697	5235	5407

amplicon	GENE	P42	P43	P44	P45	P46	P47
1	BRAF1	2545	2932	2759	3094	2676	3885
2	BRAF2	9732	11090	9953	11899	10911	12190
3	NRAS1	5597	6586	5882	7085	6479	6706
4	NRAS2	5866	6431	5449	7059	6120	6614
5	NRAS3	6174	6568	5596	7224	6511	5448
6	NRAS4	2530	211	2690	2767	20	3164
7	NRAS5	4643	4746	4289	5082	4741	5221
8	KRAS1	5840	6394	5195	7016	7080	5547
9	KRAS2	2886	3305	3022	4554	3512	2412
10	KRAS3	3750	4504	3631	4937	4593	2867
11	KRAS4	4428	4672	4126	5625	5091	6638
12	KRAS5	3694	4022	3797	4476	4722	3865
13	KRAS6	5536	5983	5601	6953	7094	6530
14	KRAS7	5007	5760	4734	7171	5848	4564
15	TP53_1	8496	9135	9454	9359	8376	10000
16	TP53_2	3320	3399	3185	3537	2943	3004
17	TP53_3	1244	1108	1515	1025	993	760
18	TP53_4	3220	2947	3020	3205	2789	2563
19	TP53_5	2023	2488	2725	3090	2284	1534
20	TP53_6	2808	3264	2448	2059	3007	2764
21	TP53_7	3473	3875	3576	4003	3728	2991
22	TP53_8	186	299	204	104	208	234
23	TP53_9	4215	4854	4636	4748	4436	5369
24	TP53_10	3462	3788	3732	3855	3092	4022
25	TP53_11	8466	9954	9681	12100	8818	7906
26	TP53_12	458	535	474	564	470	710
27	TP53_13	6580	7482	8005	7935	6892	8771
28	TP53_14	13785	16348	15918	16702	14524	14597
29	TP53_15	10966	12716	12457	11663	10956	10597
30	TP53_16	432	450	466	535	388	164
31	TP53_17	8228	9687	9400	8178	9348	11830
32	TP53_18	3669	4626	2948	4688	4221	3564
33	TP53_19	7758	9249	9956	8118	9289	11251
34	TP53_20	6079	7295	7489	6589	7230	8899
35	TP53_21	4768	5410	5860	5459	5471	5276
36	TP53_22	212	171	254	227	165	155
37	TP53_23	8548	9397	8838	5931	8407	9114
38	TP53_24	4578	5485	4338	4853	4253	4715
39	TP53_25	4442	5051	5312	5712	4593	6327
40	TP53_26	2205	2419	2524	2556	2465	1034
41	TP53_27	684	592	537	747	472	574
42	TP53_28	1945	2204	2164	2455	1939	1229
43	TP53_29	182	162	260	132	201	171
44	TP53_30	112	117	238	52	125	198
45	TP53_31	2596	2774	2567	2725	2432	3283
46	TP53_32	10242	12063	11535	12412	10629	12259
47	TP53_33	3438	3630	3968	4053	3472	3534
48	TP53_34	4688	5510	5093	5801	4603	6872
49	TP53_35	3827	4552	4323	4463	3770	4936
50	TP53_36	7652	8703	9315	9712	8524	10839
51	TP53_37	12062	13886	13531	13587	12236	12123
52	TP53_38	233	245	233	368	175	229
53	TP53_39	5243	6119	5712	5948	5772	9223

amplicon	GENE	P48	P49	P50	P51	P52	P53
1	BRAF1	4132	3891	2067	1911	2396	4286
2	BRAF2	9897	10085	5953	5185	5556	11716
3	NRAS1	5803	4472	3774	3651	3303	6708
4	NRAS2	6481	4891	3441	3226	2918	8378
5	NRAS3	5392	3640	3349	3242	2819	7216
6	NRAS4	2762	455	1727	415	1615	3814
7	NRAS5	4834	3912	2550	3052	2399	6373
8	KRAS1	5371	4576	3612	4045	3257	5977
9	KRAS2	3113	2412	1668	1706	1939	2561
10	KRAS3	3375	2744	2347	1412	1609	3759
11	KRAS4	4165	4001	2957	3049	2612	5480
12	KRAS5	3802	3402	2678	2880	2375	4182
13	KRAS6	5149	4358	3225	4069	2870	5413
14	KRAS7	4481	3777	2774	3299	2412	4835
15	TP53_1	6400	4050	4510	3339	4368	9530
16	TP53_2	2792	1856	2297	1504	2077	3788
17	TP53_3	1036	826	1531	658	828	1383
18	TP53_4	2385	1553	1896	1180	1706	3093
19	TP53_5	2299	1344	1402	815	1552	1949
20	TP53_6	2289	1244	1312	975	1440	2972
21	TP53_7	2415	1720	1775	1415	1927	3613
22	TP53_8	165	140	157	124	141	324
23	TP53_9	4917	3191	3290	2640	3404	6238
24	TP53_10	3327	1945	2272	1683	2184	5096
25	TP53_11	7322	3790	3988	3098	4564	8803
26	TP53_12	574	308	307	202	261	655
27	TP53_13	8438	4171	5027	4020	4714	9480
28	TP53_14	10657	6116	6731	5213	6732	15250
29	TP53_15	9688	5981	7179	4886	6938	12294
30	TP53_16	223	179	155	97	167	262
31	TP53_17	7990	4389	5257	3818	4581	10843
32	TP53_18	3802	2389	2594	1984	2945	4168
33	TP53_19	7081	4564	5364	4220	5057	10032
34	TP53_20	6097	3466	4199	3552	3828	8777
35	TP53_21	4419	2767	3191	2338	2982	6407
36	TP53_22	174	81	103	74	103	214
37	TP53_23	7985	4341	4821	3375	4964	11394
38	TP53_24	3670	1987	2478	1914	2478	5810
39	TP53_25	5070	2940	3641	2473	3551	6191
40	TP53_26	1258	769	899	581	950	1273
41	TP53_27	387	224	190	179	210	588
42	TP53_28	1053	595	635	420	693	1358
43	TP53_29	231	132	174	161	132	220
44	TP53_30	179	138	147	134	128	217
45	TP53_31	2171	1267	1700	1240	1428	3490
46	TP53_32	9465	5584	6756	4920	6492	12609
47	TP53_33	3654	2003	2227	1488	2108	4018
48	TP53_34	5113	3077	3660	2611	3306	7725
49	TP53_35	3188	1719	2099	1602	1973	4440
50	TP53_36	7593	4190	5571	4191	5410	10522
51	TP53_37	11131	6546	7435	5227	7481	12993
52	TP53_38	115	92	137	75	127	315
53	TP53_39	5605	3113	3723	2667	3436	6802

amplicon	GENE	P54	P55	P56	P57	P58	P59
1	BRAF1	3639	3591	2107	3440	3249	4076
2	BRAF2	9768	7916	4652	6528	6653	7448
3	NRAS1	4606	4601	2989	4932	4618	5594
4	NRAS2	5637	4788	3077	4326	4681	5768
5	NRAS3	4344	4334	2781	3889	4363	5958
6	NRAS4	378	326	410	2369	1935	4769
7	NRAS5	4563	3966	2542	3926	3731	4630
8	KRAS1	4035	4738	3336	4334	4219	6847
9	KRAS2	1664	3041	2370	3914	2106	4173
10	KRAS3	2389	3075	1969	3052	2604	3943
11	KRAS4	4533	3951	2237	3576	3713	4617
12	KRAS5	2789	2569	1562	2276	2633	3586
13	KRAS6	4692	4477	2966	4648	3699	5392
14	KRAS7	3319	4083	2624	3677	3741	5322
15	TP53_1	8298	5665	3071	5058	5458	5920
16	TP53_2	2880	2560	1822	2508	2465	3081
17	TP53_3	793	803	1010	1257	928	2038
18	TP53_4	2136	2103	1418	2691	1994	2615
19	TP53_5	1168	1949	1651	2634	1716	3028
20	TP53_6	2438	1819	1222	1709	1713	2114
21	TP53_7	2476	2416	1580	2668	2139	2505
22	TP53_8	231	143	139	145	132	128
23	TP53_9	4071	4523	3202	4594	3978	5622
24	TP53_10	3897	2852	1709	2521	2933	3163
25	TP53_11	5746	7105	4062	5938	5714	6833
26	TP53_12	583	426	270	382	447	489
27	TP53_13	7532	6876	4314	6145	6133	7424
28	TP53_14	13032	11117	5856	9608	9896	11467
29	TP53_15	8004	9416	5840	8743	8056	10200
30	TP53_16	212	182	206	537	216	264
31	TP53_17	9795	6596	3568	5177	5946	6258
32	TP53_18	2550	3419	1967	3311	2757	4641
33	TP53_19	9437	5832	3369	4959	5958	6281
34	TP53_20	7618	4497	2890	3711	4766	5271
35	TP53_21	4560	3001	2292	2661	3183	4022
36	TP53_22	119	145	110	228	124	184
37	TP53_23	8550	5894	4130	6067	6137	6717
38	TP53_24	4232	2865	1687	2475	3081	3752
39	TP53_25	4696	4398	2736	4319	3921	4718
40	TP53_26	733	1317	1226	1843	1145	1988
41	TP53_27	181	419	316	672	403	525
42	TP53_28	880	1003	767	1256	897	1295
43	TP53_29	139	138	130	165	108	177
44	TP53_30	237	104	73	81	87	135
45	TP53_31	2528	1980	1495	1994	2244	2091
46	TP53_32	9472	9203	5718	8732	8118	9667
47	TP53_33	2790	3407	2561	4312	2768	3935
48	TP53_34	5774	4372	2498	3918	4147	4964
49	TP53_35	4834	2798	1541	2077	2530	2582
50	TP53_36	9022	6552	3821	5061	6253	7571
51	TP53_37	9018	9880	6221	8624	8467	10423
52	TP53_38	247	125	110	186	156	150
53	TP53_39	7835	4249	2321	3471	3980	4153

amplicon	GENE	P60	P61	P62	P63	P64	P65
1	BRAF1	3376	2691	3701	2229	3520	2239
2	BRAF2	6556	5718	6382	7186	7488	5604
3	NRAS1	4723	3978	5148	4293	4909	3426
4	NRAS2	5360	3705	4368	4280	4663	2984
5	NRAS3	4326	3676	4817	3629	4617	2727
6	NRAS4	4568	554	3962	224	4833	427
7	NRAS5	4219	3174	3647	3427	3890	2933
8	KRAS1	5273	4060	5277	4491	5548	3704
9	KRAS2	4297	3128	3177	3071	4227	2575
10	KRAS3	3253	2511	3023	2993	3536	2526
11	KRAS4	4874	3163	3631	3602	3659	2605
12	KRAS5	3757	2336	2794	2793	3712	2143
13	KRAS6	4705	3912	4368	3800	4664	3191
14	KRAS7	4242	3372	3751	3576	4219	2953
15	TP53_1	5975	3912	5022	4689	4628	3570
16	TP53_2	2835	1786	2588	1787	2685	1760
17	TP53_3	933	1424	2095	1143	2235	826
18	TP53_4	2175	1855	2369	1894	2803	1680
19	TP53_5	2722	2130	2570	1947	3172	1871
20	TP53_6	2052	1106	1768	1177	1820	1239
21	TP53_7	3063	1765	2340	1537	2552	1979
22	TP53_8	81	68	91	48	111	83
23	TP53_9	6227	3720	4772	3728	5282	3420
24	TP53_10	3115	1767	2212	2198	2671	1746
25	TP53_11	7108	5082	5850	6192	6691	4216
26	TP53_12	466	337	440	389	505	304
27	TP53_13	7827	4710	6606	5670	6795	4056
28	TP53_14	10314	7232	9330	9026	9382	6332
29	TP53_15	9348	6272	8035	6653	8386	5932
30	TP53_16	337	258	263	242	368	213
31	TP53_17	5697	4083	5620	3865	5304	3387
32	TP53_18	4348	2949	4007	3221	3653	2388
33	TP53_19	5724	4073	5290	4371	5131	3564
34	TP53_20	4916	3064	4292	3566	4174	2774
35	TP53_21	3677	2398	3156	2731	3295	2256
36	TP53_22	238	139	176	122	228	124
37	TP53_23	5412	3778	6171	3503	6021	4515
38	TP53_24	2581	2160	2964	1823	2572	1941
39	TP53_25	4673	3437	4336	3847	4877	3235
40	TP53_26	2008	1561	1773	1079	2297	1282
41	TP53_27	452	336	471	238	591	373
42	TP53_28	1183	978	998	898	1382	779
43	TP53_29	168	99	162	85	161	135
44	TP53_30	111	60	95	81	75	80
45	TP53_31	1952	1300	1639	1263	1844	1296
46	TP53_32	9886	6329	7000	7781	8226	5631
47	TP53_33	4375	3003	3691	2767	4108	2575
48	TP53_34	4369	3200	3848	3271	3898	2691
49	TP53_35	2155	1633	2067	1944	2173	1664
50	TP53_36	7229	4477	6151	5488	5718	3783
51	TP53_37	10600	6308	8148	7558	8471	6374
52	TP53_38	141	82	116	71	137	107
53	TP53_39	4097	2302	3551	3818	4158	2803

amplicon	GENE	P66	P67	P68	P69	P70	P71
1	BRAF1	3654	2363	4197	4871	3542	2142
2	BRAF2	8571	5777	9440	12545	8873	8256
3	NRAS1	5766	4052	6015	8608	5347	4921
4	NRAS2	4782	3605	6005	7611	5011	5393
5	NRAS3	4959	3182	5339	6958	4501	3980
6	NRAS4	968	2078	5675	4427	357	3101
7	NRAS5	4825	3332	5223	6738	4378	4063
8	KRAS1	6149	4448	7669	9233	5745	4488
9	KRAS2	4086	3241	4959	7574	3234	2631
10	KRAS3	4018	2723	4613	6332	3714	2852
11	KRAS4	4348	3114	5153	7196	4007	3664
12	KRAS5	4129	2889	4535	5752	3411	3032
13	KRAS6	5561	1773	6244	8749	4473	5001
14	KRAS7	4641	3353	5696	7572	4427	3334
15	TP53_1	5951	4191	6991	8359	5660	6969
16	TP53_2	3372	2136	3548	3891	2688	2593
17	TP53_3	1423	595	1503	1371	1871	1290
18	TP53_4	2808	1998	3007	3973	2484	2001
19	TP53_5	2913	2114	2878	4442	1921	1846
20	TP53_6	2421	1355	2543	2438	1781	1086
21	TP53_7	3287	2172	3348	4529	1923	2089
22	TP53_8	199	44	192	159	106	85
23	TP53_9	5905	3964	6514	8317	5006	2807
24	TP53_10	3123	2078	3756	3830	2704	3070
25	TP53_11	6811	5185	7928	10476	6667	7480
26	TP53_12	452	388	436	671	401	333
27	TP53_13	7685	5295	8956	9760	7165	5533
28	TP53_14	10822	7794	13060	14797	10451	13021
29	TP53_15	9884	6251	11478	12614	9047	7879
30	TP53_16	422	213	387	649	191	237
31	TP53_17	5799	3937	6359	7645	5548	6069
32	TP53_18	3795	3211	4292	5372	3604	1841
33	TP53_19	5860	4077	6782	7760	5735	6449
34	TP53_20	4881	3220	5598	6572	4629	5579
35	TP53_21	3716	2868	4279	5229	3516	4337
36	TP53_22	236	123	235	317	175	128
37	TP53_23	7382	3664	7770	8137	6321	4371
38	TP53_24	3016	2116	3427	3690	2612	2612
39	TP53_25	5002	3332	5620	7354	4798	4076
40	TP53_26	2127	1561	2298	3892	1505	1357
41	TP53_27	570	464	577	904	449	309
42	TP53_28	1279	858	1515	2193	1067	1550
43	TP53_29	154	129	209	229	150	122
44	TP53_30	116	52	129	115	109	42
45	TP53_31	2017	1233	2192	2865	1698	2254
46	TP53_32	9627	6966	11253	13314	8609	9356
47	TP53_33	4373	2773	4770	6573	3412	2427
48	TP53_34	4725	3240	5295	6539	4029	3730
49	TP53_35	2698	1937	2983	3372	2312	4018
50	TP53_36	6927	5134	7951	9138	6613	6765
51	TP53_37	10489	7202	12442	14085	9268	9101
52	TP53_38	172	114	242	288	113	211
53	TP53_39	4664	3318	6256	6000	4559	5086

amplicon	GENE	P72	P73	P74	P75	P76	P77
1	BRAF1	1671	2874	4541	5496	2243	1986
2	BRAF2	4113	8578	12698	16284	6032	5063
3	NRAS1	2514	4814	4626	8224	3556	2746
4	NRAS2	2794	5559	6453	8646	3698	3536
5	NRAS3	2179	3869	5044	5808	2956	2368
6	NRAS4	918	3235	2525	3000	2107	1919
7	NRAS5	2482	4507	6111	7648	3343	2774
8	KRAS1	2236	4359	5852	8327	3215	2696
9	KRAS2	1576	2618	3804	4586	2089	1593
10	KRAS3	1806	3250	3099	5872	2297	1663
11	KRAS4	1687	4005	5371	8184	2654	1903
12	KRAS5	2050	3075	4685	6811	2337	1812
13	KRAS6	1552	4982	6670	5726	3306	2628
14	KRAS7	1807	3623	4219	5651	2352	1877
15	TP53_1	3261	8210	7532	14306	5062	3722
16	TP53_2	1583	3171	2942	5463	2001	1760
17	TP53_3	463	482	1531	1114	1199	645
18	TP53_4	1125	2088	1784	2831	1766	1361
19	TP53_5	962	1600	1534	2519	1228	1194
20	TP53_6	1160	2301	2298	2514	1394	1312
21	TP53_7	1491	3111	2593	3944	2036	1891
22	TP53_8	130	132	192	269	124	158
23	TP53_9	1745	3417	3365	6216	2693	2300
24	TP53_10	1774	3885	3327	6740	2354	1924
25	TP53_11	2932	7213	5919	10528	4462	3611
26	TP53_12	163	420	298	831	334	226
27	TP53_13	3196	6090	6115	10917	4742	3947
28	TP53_14	6115	13246	12044	22215	9033	7207
29	TP53_15	4562	8738	8673	14588	6506	5575
30	TP53_16	144	241	334	387	206	308
31	TP53_17	3735	8006	7140	14808	5641	4766
32	TP53_18	1485	2868	2950	2412	2423	1556
33	TP53_19	4024	7966	7647	15335	5308	3819
34	TP53_20	3216	5310	5807	11693	4042	2894
35	TP53_21	2326	4324	4749	8965	3434	2391
36	TP53_22	67	70	110	244	87	88
37	TP53_23	4277	6207	6688	12807	5009	4260
38	TP53_24	1664	3766	3290	5954	2140	1764
39	TP53_25	1818	4059	3832	6705	2943	2246
40	TP53_26	748	1547	1851	2494	1149	796
41	TP53_27	282	445	419	549	397	326
42	TP53_28	801	1690	1363	2561	1045	952
43	TP53_29	140	171	152	327	91	159
44	TP53_30	102	91	96	345	60	104
45	TP53_31	1437	2637	2251	4479	1687	1393
46	TP53_32	4101	9204	8737	15228	6031	4988
47	TP53_33	1677	2784	2914	4711	2201	1967
48	TP53_34	1841	4525	4130	7827	2865	2239
49	TP53_35	1954	4688	3980	8020	2741	2298
50	TP53_36	3213	7134	6271	12751	5172	3638
51	TP53_37	4987	10251	9988	17769	7410	5925
52	TP53_38	157	287	199	498	168	121
53	TP53_39	2512	5481	5056	9305	3579	3551

amplicon	GENE	P78	P79	P80	P81	P82	P83
1	BRAF1	2298	6702	2685	3147	2101	2940
2	BRAF2	5527	18009	7135	7637	5313	8530
3	NRAS1	3498	7420	4182	4559	2913	5105
4	NRAS2	4346	7816	4736	5440	3131	5727
5	NRAS3	2747	5901	4246	3981	2595	4336
6	NRAS4	1118	2859	1481	1413	2673	2417
7	NRAS5	3011	6463	3913	4148	2621	4279
8	KRAS1	3778	6983	4557	4677	3181	5014
9	KRAS2	2687	3979	2608	2944	1874	3527
10	KRAS3	2347	2412	2679	3158	2205	3017
11	KRAS4	2834	5705	3601	3470	2130	4305
12	KRAS5	2183	4619	2941	2868	1959	3175
13	KRAS6	3716	7226	4404	4536	2799	5203
14	KRAS7	3026	4651	3469	3226	2184	3102
15	TP53_1	3936	5379	6174	6217	4064	5893
16	TP53_2	1642	2243	2307	2354	1749	1984
17	TP53_3	532	729	516	768	1327	461
18	TP53_4	1487	1659	1729	1970	1609	2110
19	TP53_5	1544	1657	1628	2008	1329	1894
20	TP53_6	1502	1839	2000	1989	1309	665
21	TP53_7	1996	2561	2820	3100	1987	1701
22	TP53_8	62	172	154	204	131	27
23	TP53_9	2651	3066	3383	3504	2324	2598
24	TP53_10	2042	2919	3437	3153	2117	3202
25	TP53_11	4281	5545	6147	5991	3914	8667
26	TP53_12	285	314	351	501	259	330
27	TP53_13	4073	5019	5518	5913	4170	7138
28	TP53_14	7493	9885	12111	11411	7937	13917
29	TP53_15	5136	7327	8284	8067	5980	6668
30	TP53_16	375	323	221	412	293	382
31	TP53_17	4499	5892	7353	6889	4671	4941
32	TP53_18	2269	2188	2820	2909	2327	627
33	TP53_19	3730	5150	6476	5937	4080	4978
34	TP53_20	2859	4118	4573	4845	3298	4251
35	TP53_21	2857	3452	3874	4931	2842	4107
36	TP53_22	85	77	103	146	95	101
37	TP53_23	3780	5144	5591	6069	4260	3374
38	TP53_24	1933	2546	3423	2960	1921	2556
39	TP53_25	2610	423	3501	3486	2531	4702
40	TP53_26	1133	213	1567	1598	1096	1295
41	TP53_27	457	233	489	303	349	126
42	TP53_28	1012	1096	1402	1398	1009	1280
43	TP53_29	89	57	83	182	101	149
44	TP53_30	37	124	73	150	59	45
45	TP53_31	1401	255	1913	2088	1401	2245
46	TP53_32	5728	1043	8087	8158	5334	9412
47	TP53_33	2517	334	2603	3391	2102	2106
48	TP53_34	2692	435	3740	3834	2293	3610
49	TP53_35	1962	2608	3697	3299	2192	3546
50	TP53_36	3928	780	5952	6000	4299	5923
51	TP53_37	5742	1072	9006	8795	6117	9180
52	TP53_38	181	17	275	259	159	197
53	TP53_39	3313	527	5237	4808	3606	4508

amplicon	GENE	P84	P85	P86	P87
1	BRAF1	2173	2707	4817	3676
2	BRAF2	5195	8243	14281	9944
3	NRAS1	2783	4455	7531	5410
4	NRAS2	3567	5516	9879	6430
5	NRAS3	2615	3906	7175	4966
6	NRAS4	606	1202	6598	3196
7	NRAS5	2867	4356	7765	4905
8	KRAS1	3036	4536	9073	5613
9	KRAS2	2246	3001	5918	3648
10	KRAS3	2126	3254	5859	4025
11	KRAS4	2314	4165	7323	4891
12	KRAS5	2350	2904	5306	4005
13	KRAS6	3498	5171	9224	6767
14	KRAS7	2423	2991	5667	3754
15	TP53_1	3644	5558	9648	7894
16	TP53_2	1659	2354	3760	3042
17	TP53_3	1096	339	2324	581
18	TP53_4	1521	1887	3263	2491
19	TP53_5	1456	1589	3551	2178
20	TP53_6	1252	827	1740	1492
21	TP53_7	1633	1926	3187	2945
22	TP53_8	103	50	124	90
23	TP53_9	2400	2106	4085	4022
24	TP53_10	2136	3430	5121	4566
25	TP53_11	4132	7852	12919	9444
26	TP53_12	289	299	498	505
27	TP53_13	4040	6295	12045	7975
28	TP53_14	7436	12926	19622	15927
29	TP53_15	5260	4905	9975	8125
30	TP53_16	253	317	733	335
31	TP53_17	4155	4644	7482	7486
32	TP53_18	1819	3047	5991	4059
33	TP53_19	3838	4663	7395	7170
34	TP53_20	2901	3888	7681	5741
35	TP53_21	2523	3489	6278	5166
36	TP53_22	77	95	248	117
37	TP53_23	3875	2545	4639	5371
38	TP53_24	1884	2466	4514	4027
39	TP53_25	2361	3979	7160	5168
40	TP53_26	1095	1093	2058	1870
41	TP53_27	345	377	710	508
42	TP53_28	926	1191	2497	1761
43	TP53_29	97	89	211	180
44	TP53_30	67	37	72	104
45	TP53_31	1415	2158	3321	2812
46	TP53_32	5336	8756	14531	11285
47	TP53_33	2196	1820	4465	3284
48	TP53_34	2355	3213	5551	4959
49	TP53_35	2283	3448	4482	4651
50	TP53_36	3504	5272	8953	7475
51	TP53_37	5831	9278	14361	12423
52	TP53_38	109	176	386	254
53	TP53_39	2601	4022	6591	5093

Supplementary Table 2: KRAS, BRAF, NRAS and TP53 variants detected and their variant allele frequency (VAF) per tumor/case analyzed, the administered treatment and microsatellite status.

PATIENT	KRAS variant	KRAS allele burden	BRAF variant	BRAF allele burden	NRAS variant	NRAS allele burden	TP53 variant	TP53 allele burden	Treatment	Microsatellite instability
Patient 1	A146P	44	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 2	A146T	15	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	
Patient 3	G12A	34	Wild-type	0	Wild-type	0	R273C	26		NO
Patient 4	G12A	36	Wild-type	0	Wild-type	0	S215R	38		
Patient 5	G12A	36	Wild-type	0	Wild-type	0	R175H	32	Xelox	NO
Patient 6	G12A	41	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 7	G12D	2	Wild-type	0	Wild-type	0	L111R	3		NO
Patient 8	G12D	24	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 9	G12D	27	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 10	G12D	39	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 11	G12D	43	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	
Patient 12	G12D	45	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 13	G12D	47	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Xelox	NO
Patient 14	G12S	27	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 15	G12V	13	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 16	G12V	24	Wild-type	0	Wild-type	0	T253P fsTer92	44		
Patient 17	G12V	28	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 18	G12V	30	Wild-type	0	Wild-type	0	R282W	30		NO
Patient 19	G12V	31	Wild-type	0	Wild-type	0	R156H	27		NO
Patient 20	G13D	10	Wild-type	0	Wild-type	0	R248W	9		
Patient 21	G13D	42	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Xelox	NO
Patient 22	K147E	52	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 23	Q61H	41	Wild-type	0	Wild-type	0	R175H	51	Xelox	NO
Patient 24	Q61L	23	Wild-type	0	Wild-type	0	Cys277ValfsTer68	14	Xelox	NO
Patient 25	Wild-type	0	V600E	40	Wild-type	0	C275Y	72		NO
Patient 26	Wild-type	0	V600E	30	Wild-type	0	Wild-type	0		YES
Patient 27	Wild-type	0	V600E	8,5	Wild-type	0	R158C	9	Capecitabine	YES
Patient 28	Wild-type	0	V600E	20	Wild-type	0	Wild-type	0		YES
Patient 29	Wild-type	0	V600E	32	Wild-type	0	R196*	84	Xelox	
Patient 30	Wild-type	0	V600E	6	Wild-type	0	V272M	1,8		NO
Patient 31	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	His178ProfsTer3	42	Capecitabine	NO
Patient 32	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	R282W	23	Xelox	NO
Patient 33	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Q192*	85		NO
Patient 34	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	G112-	68		NO
Patient 35	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Pro152AlafsTer14	63	Xelox	NO
Patient 36	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	N247I	74		NO
Patient 37	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Leu201GlyfsTer47	50		
Patient 38	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Tomox	
Patient 39	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	c.376-2A>G SPLICE	54		NO
Patient 40	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	V173L	89	Xelox	
Patient 41	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	R248Q	21	Tomudex	NO
Patient 42	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		YES
Patient 43	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	C135F	17		NO
Patient 44	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Xelox	NO
Patient 45	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	NO
Patient 46	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 47	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 48	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		YES
Patient 49	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 50	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	R175H	1,5		NO
Patient 51	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	R282W	48	Xelox	NO
Patient 52	Wild-type	0	Wild-type	0	mutado	2,5	Wild-type	0		
Patient 53	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 54	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Xelox	NO
Patient 55	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	NO
Patient 56	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Xelox	NO
Patient 57	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 58	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 59	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 60	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	NO
Patient 61	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO

Patient 62	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 63	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 64	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	
Patient 65	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 66	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 67	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 68	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Xelox	NO
Patient 69	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 70	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Xelox/RT	
Patient 71	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	
Patient 72	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	
Patient 73	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 74	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	R248W	62	Tomox	
Patient 75	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	S366A	41	Xelox	NO
Patient 76	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Utefox	NO
Patient 77	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 78	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Xelox	YES
Patient 79	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Cisplatin/Etoposide	
Patient 80	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 81	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 82	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	
Patient 83	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Capecitabine	NO
Patient 84	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 85	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		
Patient 86	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO
Patient 87	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0	Wild-type	0		NO

Supplementary Table 3: Ad-hoc statistical power estimation for the Chi-Square and Fisher exact tests used to estimate the significance of potential association between the distinct gene mutations identified in our patient cohort and the clinical and biological characteristics of the disease

<i>KRAS</i> mutational status					
Variable	Categories	N. of Cases (%)	KRAS mutation	P-value	Power (1-β)
Site of primary tumor	Right Colon	44 (51)	17 (39)	0.05	1.00
	Left Colon	39 (45)	7 (18)		
	Rectum	4 (4)	0 (0)		
Grade of differentiation	Well	24 (30)	12 (50)	0.04	1.00
	Moderadate	49 (61)	10 (20)		
	Poor	7 (9)	2 (29)		
Lymphovascular Invasion	No	68 (78)	22 (32)	0.05	0.43
	Yes	19 (22)	2 (11)		
<i>BRAF</i> mutational status					
Variable	Categories	N. of Cases (%)	BRAF mutation	P-value	Power (1-β)
Grade of differentiation	Well	24 (30)	0 (0)	0.02	1.00
	Moderadate	49 (61)	3 (6)		
	Poor	7 (9)	2 (29)		
Peritoneal carcinomatosis	No	80 (91)	3 (4)	0.006	0.79
	Yes	7 (9)	3 (43)		
Microsatellite instability	No	48 (89)	2 (4)	0.007	0.75
	Yes	6 (11)	3 (50)		
<i>TP53</i> mutational status					
Variable	Categories	N. of Cases (%)	TP53 mutation	P-value	Power (1-β)
Gender	Male	51 (59)	21 (41)	0.05	0.54
	Female	36 (41)	8 (22)		

Bold letters indicate adequate statistical power (Power (1-β) > 0.8).

Only variables that displayed a statistical significant association with the mutational status of the different genes investigated are included in this table. Other clinical and biological disease features statistically not significantly associated with the mutational status for the investigated genes showed a statistical power below the established threshold of >0.80, due to small sample size.

Supplementary Table 4: Statistical power calculation for progression free survival (PFS) and overall survival (OS) based on the log-rank test

Progression free survival				
Variable	N. of cases	% 2-year PFS	P-value	Power (1-β) (2-tail)
Gender				
Male	41	90%	0.03	0.77
Female	33	63%		
TNM stage at diagnosis				
Stage 0/I/II	42	91%	<0.001	0.43
Stage III	26	75%		NAN
Stage IV	6	0%		NAN
Grade of differentiation				
Well	22	95%	0.03	0.41
Moderate	46	77%		0.94
Poor	6	33%		0.82
Lymphovascular invasion				
No	60	83%	0.004	0.73
Yes	14	54%		
Perineural invasion				
No	57	83%	0.03	0.49
Yes	17	62%		
<i>BRAF</i>				
Wild type	69	79%	0.05	0.20
Mutated	5	60%		
Overall survival				
Variable	N. of cases	% 2-year OS	P-value	Power (1-β) (2-tail)
TNM stage at diagnosis				
Stage 0/I/II	42	97%	0.02	0.31
Stage III	26	88%		0.45
Stage IV	6	80%		0.08
Tumor size				
<4 cm	44	100%	0.005	0.00
≥4 cm	30	81%		
Microsatellite instability				
No	43	92%	0.01	0.97
Yes	5	40%		
<i>BRAF</i>				
Wild type	69	94%	0.001	0.24
Mutated	5	80%		

NAN: it is not possible to calculate this value.

Bold letter indicate adequate statistical power (Power (1-β)> 0.8).

2. Artículo 2: “Heterogeneidad del estado mutacional de *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* y *BRAF* en muestras pareadas de tumores primarios, ganglios linfáticos y metástasis hepáticas obtenidas de pacientes con cáncer colorrectal metastásico”.

OBJETIVOS: A día de hoy es bien sabido que las mutaciones activadoras en los genes *KRAS* y *NRAS* se asocian con una respuesta deficiente a las terapias anti-EGFR en pacientes con cáncer colorrectal (CCR) metastásico. Además, se ha visto que aproximadamente la mitad de los pacientes con CCR con *KRAS* nativo (no mutado) no responden a estas terapias. Esta ausencia de respuesta al tratamiento podría deberse a que la decisión terapéutica se basa en el perfil mutacional del tumor primario, sin considerar la posibilidad de que coexistan pequeños subclones de células tumorales con mutaciones en RAS en otras muestras tumorales del paciente, ganglios linfáticos metastásicos o metástasis hepáticas.

MATERIAL Y MÉTODOS: En este trabajo analizamos el perfil mutacional de los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *PI3KCA* mediante PCR específica de alelo en formato de microarrays de baja densidad en muestras pareadas de 26 tumores primarios, 16 ganglios metastásicos y 34 muestras de metástasis hepáticas procedentes de 26 pacientes con CCR metastásico no tratados (n = 76 muestras) .

RESULTADOS: De manera global se detectaron un total de 37 mutaciones en las 76 muestras tumorales analizadas (11 en tumores primarios, 9 en metástasis ganglionares y 17 en metástasis hepáticas). Las mutaciones más frecuentemente encontradas en tumores primarios fueron *KRAS* (15%) y *PI3KCA* (15%), seguidas por *NRAS* (8%) y *BRAF* (4%). La distribución de las mutaciones encontradas en las 16 metástasis ganglionares analizadas fue la siguiente: 4 muestras (25%) presentaron mutaciones en el gen *KRAS*, 3 (19%) en el gen *NRAS* y 1 mutación en cada uno de los genes *PI3KCA* y *BRAF* (6%). Como era de esperar, la mutación más prevalente en las

metástasis hepáticas fue en el gen *KRAS* (35%), seguido de los genes *PI3KCA* (9%) y *BRAF* (6%). De los 26 pacientes estudiados, 15 (58%) mostraron una concordancia global entre las mutaciones detectadas en las metástasis ganglionares y las metástasis hepáticas en comparación con el tumor primario, lo que sugiere la ausencia de evolución clonal. Por el contrario, los 11 pacientes restantes (42%) no mostraron concordancia entre los perfiles mutacionales identificados entre los tumores primarios y las muestras ganglionares/metástasis hepáticas, sugiriendo la presencia de evolución clonal a nivel inter-tumoral.

CONCLUSIONES: En este estudio confirmamos la presencia de diferentes perfiles mutacionales entre tumores primarios, metástasis ganglionares y metástasis hepáticas. Estos hallazgos sugieren la necesidad de realizar el análisis mutacional en todas las muestras tumorales disponibles de los pacientes con CCR metastásico antes de tomar decisiones terapéuticas con anticuerpos monoclonales anti-EGFR.

Spatio-temporal tumor heterogeneity in metastatic CRC tumors: a mutational-based approach

Sofía del Carmen^{1,*}, José María Sayagués^{2,*}, Oscar Bengoechea¹, María Fernanda Anduaga³, Jose Antonio Alcazar³, Ruth Gervas¹, Jacinto García³, Alberto Orfao^{2,**}, Luis Muñoz Bellvis^{3,**}, María Eugenia Sarasquete^{4,**} and María del Mar Abad^{1,**}

¹Department of Pathology and IBSAL, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

²Cytometry Service-NUCLEUS, Department of Medicine, Cancer Research Center (IBMCC-CSIC/USAL) and IBSAL, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

³General and Gastrointestinal Surgery Service and IBSAL, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁴Hematology Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

*These authors have contributed equally to this work

**These authors have contributed equally to this work and they should be considered as senior last authors and corresponding authors

Correspondence to: María Eugenia Sarasquete, **email:** mealonos@saludcastillayleon.es
María del Mar Abad, **email:** marabad@usal.es

Keywords: colorectal cancer; clonal evolution; anti-EGFR; mutational profile; tumor heterogeneity

Received: June 30, 2018

Accepted: August 10, 2018

Published: September 28, 2018

Copyright: del Carmen et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

It is well known that activating mutations in the *KRAS* and *NRAS* genes are associated with poor response to anti-EGFR therapies in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). Approximately half of the patients with wild-type (WT) *KRAS* colorectal carcinoma do not respond to these therapies. This could be because the treatment decision is determined by the mutational profile of the primary tumor, regardless of the presence of small tumor subclones harboring RAS mutations in lymph nodes or liver metastases. We analyzed the mutational profile of the *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PI3KCA* genes using low-density microarray technology in samples of 26 paired primary tumors, 16 lymph nodes and 34 liver metastases from 26 untreated mCRC patients (n=76 samples). The most frequent mutations found in primary tumors were *KRAS* (15%) and *PI3KCA* (15%), followed by *NRAS* (8%) and *BRAF* (4%). The distribution of the mutations in the 16 lymph node metastases analyzed was as follows: 4 (25%) in *KRAS* gene, 3 (19%) in *NRAS* gene and 1 mutation each in *PI3KCA* and *BRAF* genes (6%). As expected, the most prevalent mutation in liver metastasis was in the *KRAS* gene (35%), followed by *PI3KCA* (9%) and *BRAF* (6%). Of the 26 cases studied, 15 (58%) displayed an overall concordance in the mutation status detected in the lymph node metastases and liver metastases compared with primary tumor, suggesting no clonal evolution. In contrast, the mutation profiles differed in the primary tumor and lymph node/metastases samples of the remaining 11 patients (48%), suggesting a spatial and temporal clonal evolution. We confirm the presence of different mutational profiles among primary tumors, lymph node metastases and liver metastases. Our results suggest the need to perform mutational analysis in all available tumor samples of patients before deciding to commence anti-EGFR treatment.

INTRODUCTION

Sporadic colorectal cancer (sCRC) is the third most frequently diagnosed cancer worldwide and the third most common cause of cancer-related death [1]. Approximately 300,000 new cases of sCRC are reported each year and 200,000 patients (67% of cases) die from cancer-related complications, most of them as a consequence of the metastatic process (i.e., mostly liver metastasis) [2]. In recent years, therapies with anti-EGFR agents targeting the metastatic process have improved sCRC outcome, but only a subset of selected patients benefit from these treatments [3]. It is well known that activating mutations in the *KRAS* (35% of cases) and *NRAS* (1-3%) genes are associated with poor response to anti-EGFR therapies, which rules out anti-EGFR-directed therapy as an option for these patients [4]. The *BRAF* V600E mutation occurs in 10-15% of metastatic CRC (mCRC) cases [5], but does not predict resistance to anti-EGFR therapies. However, *BRAF* mutation is a strong marker of poor prognosis in mCRC [5]. Genetic events in additional nodes of the EGFR pathway, such as *PI3KCA* exon 20 mutations, may also confer resistance to anti-EGFR therapies [6, 7]. In addition, up to 50% of the patients with wild-type (WT) *KRAS* colorectal carcinoma do not respond to this therapy, possibly because the decision to treat is determined by the mutational profile of the primary tumor, regardless of the presence of small tumor subclones harboring RAS mutations in lymph nodes or liver metastases. The most recent European Society for Medical Oncology (ESMO) guidelines for the management of patients with metastatic sCRC recommend that RAS mutation testing be performed in either primary tumor or liver metastasis samples, tissue from other metastatic sites, such as lymph node metastases, may be used if neither a primary tumor nor a liver metastasis sample are available [8]. Most studies have employed primary tumor samples from sCRC patients to define the mutations of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PI3KCA* genes [9, 10]. However, apparently contradictory results have been reported about the concordance between the mutational status of these genes in primary tumors and their corresponding liver metastases. Thus, while several papers report full concordance between primary tumors and liver metastases [11–13], others have found up to 31% [14] of discrepancies. In addition, studies comparing the mutation distribution in primary tumors and lymph node metastases in the same patient are scarce [15, 16]. Our research group has recently provided detailed information, obtained from the use of FISH and high-density single-nucleotide polymorphism (SNP) array techniques, about the clonal heterogeneity and genetic diversity within a given tumor, whereby different abnormalities coexist in the same tumor sample (intratumoral heterogeneity) [17]. However, the precise patterns of intratumoral clonal evolution estimated from the mutational profile of the genes associated with the EGFR signaling pathway, and

their relationship with the neoplastic clones present in primary vs. lymph node metastases vs. metastatic tumor samples (intertumoral heterogeneity) remain controversial. It is important to identify intratumoral and intertumoral heterogeneity since both could affect the response to targeted therapies.

Here, we analyzed the mutational profile of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PI3KCA* genes using low-density microarray technology in samples of 26 paired primary tumors, 16 lymph nodes and 34 liver metastases from 26 untreated mCRC patients (n=76 samples). Our aims were: (1) to identify mutational profile differences between paired primary vs. lymph node metastases vs. multiple liver metastases samples that might explain resistance to therapies in WT primary tumor, and (2) to describe the spatial intratumoral heterogeneity and temporal clonal evolutionary processes.

RESULTS

Mutation frequencies and intratumoral and intertumoral genetic heterogeneity

In all DNA samples a successful amplification of the mutant or WT allele was obtained by PCR. Mutations in at least one of the analyzed genes and/or one tumor sample (primary tumor, lymph node metastases or liver metastases) were found in 13 patients (50% of cases). Overall, 37 mutations were detected in the 76 tumor samples (11 in primary tumors, 9 in lymph node metastases and 17 in liver metastases). The mutations found in primary tumors were most frequently of the *KRAS* and *PI3KCA* genes (each with 4/26 cases; 15%), followed by those of the *NRAS* (2/26; 8%) and *BRAF* (1/26; 4%) genes. The mutations in the 16 lymph node metastases were distributed as follows: 4 (25%) in *KRAS*, 3 (19%) in *NRAS* and 1 in each of the *PI3KCA* and *BRAF* genes (6%). As expected, the most prevalent mutation in liver metastases was in the *KRAS* gene (12/34; 35%), followed by the *PI3KCA* (3/34; 9%) and *BRAF* (2/34; 6%) genes.

Detailed information about each patient and their sample mutation profile is provided in Table 1. Of the 26 cases studied, 15 (58%) displayed an overall concordance in the mutation status detected in the lymph node metastases and liver metastases compared with primary tumor (13 cases were WT and the other two had a *KRAS* mutation: G12D and G12V), suggesting no clonal evolution. In contrast, in the other 11 patients (42%), the mutation profile differed between the primary tumor and lymph node/metastasis samples, suggesting intertumoral clonal evolution.

Figure 1 summarizes the hypothetical pathways of intratumoral and intertumoral clonal evolution detected in these samples. The mutation profile identified in primary tumors was considered the founder clone portrait, the

Table 1: Details of the clinical, biological and genetic characteristics and type of sample studied of each individual metastatic colorectal cancer patient analyzed in this study (n=26)

Patients	Gender	Age (Years)	CLINICAL FEATURES							GENETIC PROFILE OF ANALYZED SAMPLES					
			CEA Serum levels (ng/ml)	Site of PT	Histological grade	PT size (cm)	TNM stage	Peritoneal metastasis	Other metastases	PT	Lymph node	LM #1	LM #2	LM #3	LM #4
1	M	60	29.4	Right colon	Well	3.8	T3N0M1	No	No	WT	-	WT	-	-	-
2	M	74	148.4	Right colon	Well	4	T3N2M1	No	No	WT	WT	WT	-	-	-
3	M	76	44	Right colon	Moderate	5.5	T3N1M1	No	Lung	WT	WT	<i>KRAS</i> (G12D)	-	-	-
4	M	62	155.2	Right colon	Moderate	3	T3N2M1	No	Lung	<i>KRAS</i> (G12D)	<i>KRAS</i> (G12D)	<i>KRAS</i> (G12D)	-	-	-
5	M	69	7.6	Left colon	Well	3	T3N0M1	Yes	Lung	WT	-	WT	-	-	-
6	M	64	256	Left colon	Well	7	T3N0M1	No	No	WT	-	WT	-	-	-
7	M	61	2.3	Left colon	Well	5	T3N2M0	Yes	No	<i>KRAS</i> (G12D) <i>PI3K</i> (E545K/D)	<i>KRAS</i> (G12D)	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>KRAS</i> (G12D) <i>PI3K</i> (H1047R)*	-	-
8	M	57	30.9	Left colon	Well	6	T3N1M1	No	No	<i>PI3K</i> (H1047R)	<i>BRAF</i> (V600E) <i>NRAS</i> (G12D)	<i>KRAS</i> (G12D)*	<i>PI3K</i> (H1047R)*	<i>KRAS</i> (G12D)*	-
9	F	67	233.7	Left colon	Well	7	T3N1M1	No	No	<i>KRAS</i> (G12D)	<i>KRAS</i> (G12D) <i>NRAS</i> (Q61K)	<i>KRAS</i> (G12D)	<i>KRAS</i> (G12D)	<i>KRAS</i> (G12D)	-
10	M	77	244.9	Left colon	Well	5.5	T3N1M1	No	No	WT	-	WT*	-	-	-
11	M	61	1.2	Left colon	Moderate	3	T2N0M0	No	No	WT	-	WT*	-	-	-
12	F	75	1145	Left colon	Moderate	9	T4N1M1	Yes	Lung	<i>NRAS</i> (G12D)	<i>NRAS</i> (Q61K)	<i>KRAS</i> (G12V)	-	-	-
13	F	58	501	Left colon	Moderate	5	T4N2M1	Yes	Lung	WT	WT	WT	-	-	-
14	M	72	45.4	Left colon	Poorly	4	T3N1M1	Yes	No	WT	WT	WT	-	-	-
15	F	48	32.9	Left colon	Poorly	4	T4N2M1	Yes	No	<i>PI3K</i> (E545K/D)	<i>KRAS</i> (G12D)	<i>BRAF</i> (V600E)	-	-	-
16	M	66	3.7	Rectum	Well	8.5	T3N0M0	No	No	WT	-	WT*	-	-	-
17	F	62	139	Rectum	Well	4	T3N0M1	No	No	WT	-	WT	-	-	-
18	M	74	6.4	Rectum	Well	5	T3N1M0	No	No	<i>BRAF</i> (V600E)	WT	<i>KRAS</i> (G12A)	-	-	-
19	M	75	589.2	Rectum	Well	4	T3N1M0	No	No	WT	<i>PI3K</i> (E545K/D)	WT*	-	-	-
20	M	77	58.3	Rectum	Well	9	T3N1M1	No	No	WT	WT	<i>PI3K</i> (E545K/D)	-	-	-
21	M	63	23.2	Rectum	Well	7	T3N2M1	No	No	WT	WT	WT	-	-	-
22	M	64	5.4	Rectum	Well	7	T4N0M0	No	No	WT	-	WT*	-	-	-
23	M	79	0.8	Rectum	Well	5	T4N0M1	No	No	<i>KRAS</i> (G12V)	-	<i>KRAS</i> (G12V)	-	-	-
24	F	76	149.8	Rectum	Moderate	2.5	T3N1M1	No	No	WT	WT	WT	WT	WT	WT
25	F	49	6.8	Rectum	Moderate	6.5	T3N1M1	No	No	<i>PI3K</i> (E545K/D)	WT	<i>KRAS</i> (G12V)	-	-	-
26	M	74	110	Rectum	Moderate	5	T4N0M1	No	No	<i>NRAS</i> (Q61H)	-	WT	-	-	-

Abbreviations: M: male; F: female; CEA: carcinoembryonic antigen; PT: primary tumor; LM: different liver metastases developed in each patient; well: well-differentiated adenocarcinoma; moderate: moderately differentiated adenocarcinoma; poor: poorly differentiated adenocarcinoma; WT: wild-type; -: not applicable. *metachronous sample.

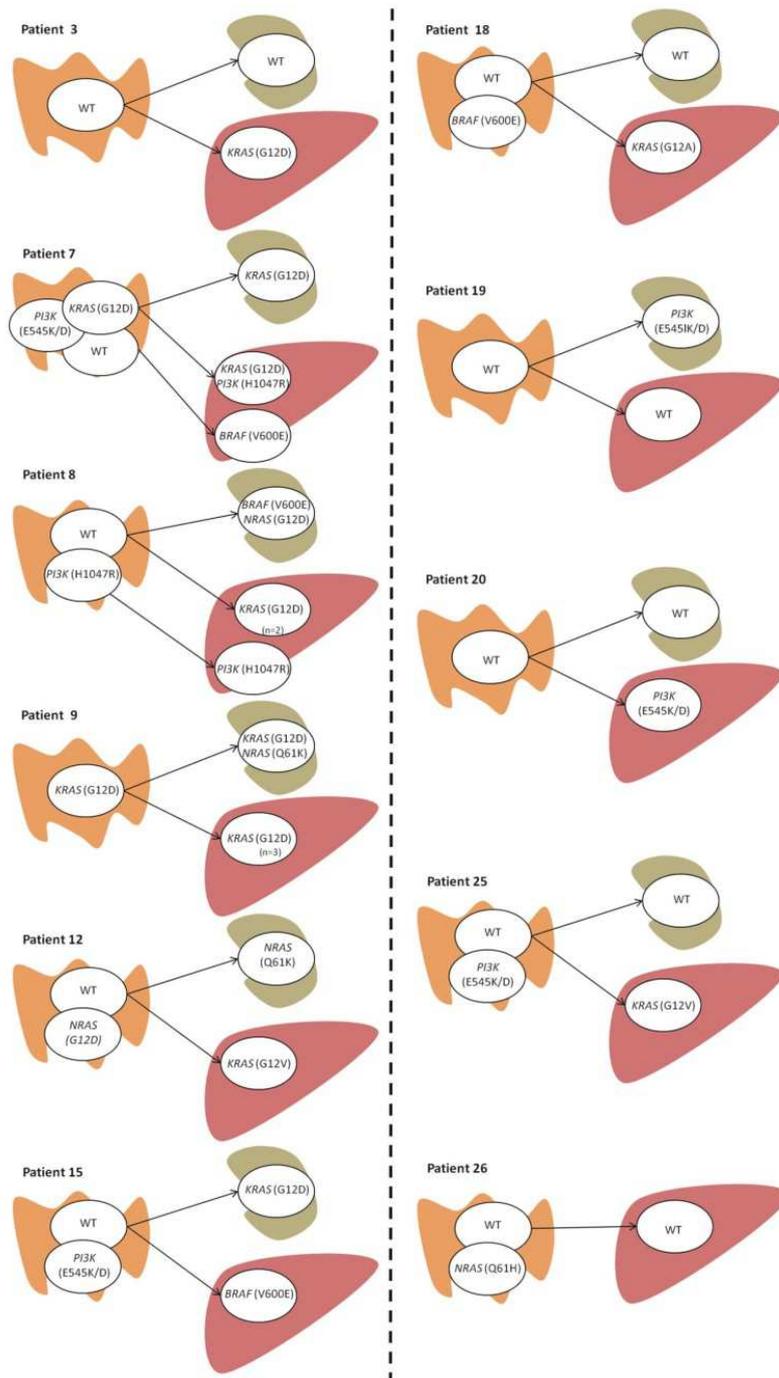


Figure 1: Intratumoral and intertumoral mutation heterogeneity of primary colorectal carcinomas as determined by the presence of different mutation status for *KRAS*, *NRAS*, *PIK3* and *BRAF* genes. Only those patients with mutation heterogeneity across the three tumor samples in one or more of the four examined genes are shown (n=11). A detailed description of all patients (n=26) and samples (number and type) analyzed can be found in Table 1. Each circle represents a tumor cell clone detected in the sample analyzed. Tissue origin is represented by the following pictures: for the primary tumor, lymph node, liver metastasis. If more than one sample per tissue was studied it is mentioned in the figure (n= number of samples).

most common profile being characterized by the presence of two clones (n=6), one of which harbored a mutation in *PI3KCA* (n=3), *BRAF* (n=1) or *NRAS* (n=2), and the other one being a WT clone. However, there were four cases where the primary tumor was characterized by the presence of only one clone (n=4)—either a WT clone (n=3) or a mutated *KRAS* clone (n=1)—and another patient with three clonal populations in the primary tumor (a WT subclone and two subclones with *KRAS* and *PI3KCA* mutations). With respect to the lymph node metastasis status, all cases presented with one clonal population; four cases were WT and six cases harbored different mutations. Of the latter mutated cases, two were characterized by the presence of a *KRAS* mutation, and there were single cases each of an *NRAS* mutation, simultaneous *BRAF/NRAS* mutations, a *KRAS/NRAS* mutation, and a *PI3KCA* mutation. Only one of the six cases had a mutation concordant with its primary tumor sample.

Considering the liver metastases, nine cases showed one clonal population, the most frequent being a *KRAS*-mutated clone (n=5), followed by a WT clone (n=2), and *BRAF* (n=1) and *PI3KCA* (n=1) mutated clones. The two other cases had two clonal populations, the first with *KRAS* and *PI3KCA* mutated clones, and the second with one clone featuring a *KRAS* plus *PI3KCA* mutation and a second clone exhibiting a *BRAF* mutation.

Clonal evolution patterns

Two patterns of clonal evolution are plausible from the evidence of these samples: (1) no evolution, when the mutation profile in the primary tumor is the same as in the lymph node metastases or liver metastasis sample and (2) linear evolution, when the primary tumor profile acquires additional mutations during the process of migration to the lymph node or liver.

Regarding the transition from primary tumor to the lymph node metastases, five cases showed no clonal evolution (patients 3, 7, 18, 20 and 25) and five cases displayed linear evolution (patients 8, 9, 12, 15 and 19). For the cases of primary tumor to liver metastasis, no evolution pattern was observed in three (patients 9, 19 and 26), and linear evolution was detected in seven of them (patients 3, 7, 12, 15, 18, 20 and 25). One case showed a mixed pattern (patient 8), whereby a WT clone acquired a *KRAS* mutation that was present in two liver metastasis samples (linear evolution) and another *PI3KCA*-mutated clone without any evolution.

DISCUSSION

Approximately 30% of patients with sCRC have *KRAS* mutations and are resistant to EGFR inhibitors, and up to 50% of metastatic colorectal cancer (mCRC) cases with *KRAS* wild-type (WT) do not respond to anti-

EGFR therapies [18, 19]. The presence of a *KRAS* WT genotype in the primary tumors from mCRC patients does not guarantee any benefit from EGFR inhibitors [19], so the availability of other factors that could predict treatment resistance is of great importance for identifying which *KRAS* WT mCRC patients will be non-responders and who will develop resistance after an initial response.

The aim of this study was to describe the intertumoral heterogeneity of mCRC tumors through the mutation frequency of four key driver genes (*KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* and *BRAF*) in 76 samples from 26 untreated mCRC patients at diagnosis corresponding to 26 primary tumors, 16 lymph node metastases and 34 liver metastasis samples and then to establish the intratumoral pathways of clonal evolution. To the best of our knowledge, this is the first study to propose and test a hypothetical model of intratumoral and intertumoral clonal evolution of the most frequently altered genes (*KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* and *BRAF*), comparing the mutational status in liver metastases, lymph node metastases versus paired primary colorectal tumors, using low-resolution arrays. Overall, our results show that colorectal cancers are highly heterogeneous tumors at the intratumoral and intertumoral genetic levels, which probably affects the response to targeted anti-EGFR agents.

Primary tumor heterogeneity is a well-recognized challenge to personalized medicine [20–22]. Previous studies have revealed clonal heterogeneity of *KRAS* mutations within primary mCRC [23, 24] and regarding the concordance in mutation status between primary tumors and metastatic deposits [25, 26]. However, mutational heterogeneity across synchronous deposits and lymph node metastases is not well described. Taking *KRAS* mutations as an example, some studies showed 100% concordance between primary CRC tumors and paired metastases [12, 13], while others reported 4–30% discordance [14, 15]. Losi *et al.* [11] studied primary tumors and paired metastases from 35 patients, and found that *KRAS* mutations were present in 71% of cases with 100% concordance, even in the local recurrences of the same patient. However, the literature suggests an incidence of *KRAS* mutations in approximately 45% of cases with mCRC [9, 27, 28]. In addition, the series analyzed by Knijn *et al.* (n=305 patients) showed 96% concordance in the *KRAS* gene status between primary tumor and paired liver metastases [29]. This finding is consistent with *KRAS* mutations mostly occurring as an early molecular event. On the other hand, there is increasing evidence of a degree of discordance in the *KRAS* mutational status between different tumoral samples from the same patient. Recently, Jeantet *et al.* [30] reported that 33% of cases with spatial intratumoral heterogeneity for *RAS* mutations coexisted within the same tumor with *KRAS* and/or *NRAS* mutated and WT zones. Kosmidou *et al.* [31] found similar intratumoral heterogeneity of *KRAS* mutations (44% discordance) when they compared tumor

center and tumor periphery. Al-Mulla *et al.* [16] analyzed *KRAS* status in 26 liver metastases and 31 lymph node samples and detected an overall discordance rate of 19% in the two subgroups compared with the primary tumor. Furthermore, the discordance reached 30% in the series analyzed by Albanese *et al.* [14]. Likewise, Miranda *et al.* [32] found different rates of *KRAS* mutations in lymph nodes (19%), liver metastases (38%) and primary tumors (32%) in 101 sCRC patients. The lower mutation rate in lymph nodes compared with primary tumors may indicate that neoplastic cells colonizing lymph nodes leave the primary tumor before *KRAS* alterations occur, or, if it is assumed that the primary tumor comprises different cell clones, one of these clones is responsible for survival and proliferation in the cells of the primary site. On the other hand, the presence of higher rates of *KRAS* mutations in liver metastases can be explained by the gradual acquisition of mutations as a secondary alteration during disease progression.

Other genes involved in the EGFR signaling pathway (*NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA*) have been widely studied in primary sCRC. Mao *et al.* in their review and meta-analysis [26], examined the concordance of *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* mutational status between primary tumors and metastases, finding high concordance rates among liver metastases with primary tumor, but low concordance for the three biomarkers with lymph node metastases. Baldus *et al.* [15] studied 100 patients and found major discordances in primary tumor versus lymph node metastases, whereby 17 out of 55 patients (31%) whose *KRAS* mutation profile was examined had a discordant result. This heterogeneity was also found in 4% and 13% of cases for *BRAF* and *PIK3CA*, respectively. As we have previously shown with FISH and high-density single-nucleotide polymorphism (SNP) array techniques [17], the metastases from an individual with mCRC are extremely similar to each other but are divergent from the paired primary tumor. Particular clonal genetic events present in the metastasis samples can also be found in restricted subclones of the primary tumor, suggesting that only some tumor cells within the primary tumor have the ability to metastasize, as is sometimes observed in human medulloblastoma [33]. Another explanation for our findings is that the primary tumor may have been reseeded by a metastatic clone that had experienced additional genetic events at the periphery. In our series, mutations of the *KRAS* gene were more frequent in liver metastases (36%) than in primary tumors (16%). The greater incidence of *KRAS* mutations in liver metastases implies that they are acquired mutations. There is a general consensus that cancer progression arises from a single mutated cell, followed by a clonal expansion associated with genetic alterations. The acquisition of these alterations can result in the emergence of new tumor subclones with different genotypes. In this context, we observed that 13 out of 16 WT primary tumors did not

change their molecular profile during disease progression, which means that it is more likely that WT primary tumors will not clonally evolve. This may be because they are made up of a single non-mutated clone and are genetically stable; several studies have examined prognostic markers of outcome after liver resection for colorectal cancer metastases and concluded that genetic stability is associated with a better outcome [34]. In addition, we observed that in 5 of the 11 cases showing linear clonal evolution between the primary tumor and the lymph node metastasis, four were WT clones. As previously discussed [15, 32], the lower incidence of mutations in lymph node metastases indicates that these metastases are caused by tumor clones that escape from the primary tumor in the early stages of the disease, before *KRAS* or other mutations occur. In addition, clonal selection during the metastatic process is noted, since the mutations in *PIK3CA* are not observed during tumor progression (only two cases had acquired *PIK3CA* mutations in liver metastases). Clones with mutated *KRAS* are observed from the outset or during the metastatic process. It is well known that *RAS* and *BRAF* mutations are mutually exclusive [35], but our study shows that the presence of either a *KRAS* or a *BRAF* mutation in primary tumor or at metastatic sites, does not preclude the presence of the other mutation in a different location. The presence of distinct mutations among samples of the same patient suggests that there might be different tumor clones in a primary tumor and as the disease progresses the mutational profile of the clones is modified.

Since only *KRAS* and *NRAS* mutations preclude patients from being treated with EGFR inhibitors, and in clinical practice most mutational status studies are performed in primary tumors [8], in our series, 20 of the 26 patients would have been classified as WT, and thereby candidates for anti-EGFR treatments. Of these 20 WT primary tumor patients, five had mutations in *KRAS* or *NRAS* in lymph nodes or liver metastases, which means that if only primary tumors had been analyzed when looking for mutations in *KRAS* and *NRAS*, five mutant, EGFR inhibitor-resistant cases would have been misdiagnosed. The presence of different tumor clones in a primary malignancy and at its metastatic sites, along with clonal evolution in sCRC might explain why some patients do not respond to EGFR inhibitors, and confirm the utility of evaluating *KRAS* and *NRAS* mutations not only in primary tumors, but also at all metastatic sites.

In summary, in this study we confirm the presence of different mutational profiles in primary tumors, lymph node metastases and liver metastases. We believe that the presence of acquired mutations in genes involved in the EGFR pathway at metastatic sites could explain why not all patients respond to EGFR. These results highlight the need to analyze the mutations in all available tumoral samples of the patient before deciding upon anti-EGFR treatment. Larger studies assessing the therapeutic impact

of the mutation portrait detected in the different tumor samples of the same patient are needed.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

Tissue specimens from 26 sporadic colorectal carcinomas, 16 paired lymph node metastases and 34 paired liver metastases (n=76 samples) were obtained from 26 patients (19 males and 7 females) before any systemic treatment or local radiotherapy was given. The median age was 67 years (range, 48-79 years). All patients had undergone surgical resection of tumor tissues (primary tumors, metastatic lymph nodes and liver metastases) at the Department of Surgery of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain) between 2000 and 2013, and they were recruited into the study after they had given their informed consent to participate. The study underwent institutional review and was approved by the Local Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain).

Salient clinical and laboratory data of the 26 patients studied are fully described in Table 1 and summarized in Supplementary Table 1. All tumors were diagnosed and classified according to the WHO criteria [36] and staged according to the TNM Classification of Malignant Tumours (6th edition) [37]. By tumor grade, there were 16, 8 and 2 cases of well, moderately and poorly differentiated carcinomas. The histopathological grade of all tumors was confirmed in a second independent evaluation by an experienced pathologist.

Eleven primary tumors were localized in the rectum and the other 15 were in the right (caecum, ascending or transverse) or left (descending or sigmoid) colon. The median size of the primary tumors was 5.3 cm (range, 2.5-9.0 cm) with the following distribution by TNM stage: T2N0M0, 1 tumor; T3N0M0, 1; T3N0M1, 4; T3N1M0, 2; T3N1M1, 8; T3N2M0, 1; T3N2M1, 3; T4N0M0, 1; T4N0M1, 2; T4N1M1, 1; and; T4N2M1, 2 tumors. Paired liver metastases were identified at the time of colorectal surgery or during the first year after initial diagnosis (n=25); the mean size of the largest liver metastases was 4.0 cm (range, 0.5-10.0 cm).

Once the histopathological diagnosis had been established, sections from paraffin-embedded tissue samples were cut from three representative areas of the tumor tissue with >70% tumor cell infiltration as established by hematoxylin-eosin staining, after excluding stroma-enriched tumor areas. In order to enrich the tumor cells, the neighboring areas of those containing $\geq 70\%$ tumor cells were then microdissected from the paraffin-embedded tumor tissue samples by an experienced pathologist. DNA was extracted and isolated using a Maxwell® 16 System for Genomic DNA Extraction (Promega, Mannheim, Germany) and quantified using a

Qubit dsDNA BR assay (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA).

Mutational analysis using low-density microarray technology

After the histopathological diagnosis, primary tumor, lymph node metastasis and paired liver metastasis of each patient were tested for mutations in the *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PI3K* genes using a multiplex allele-specific PCR-based assay, which assesses 44 mutations in *KRAS* codons 12, 13, 59, 61, 117 and 146 (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D, A59E, A59G, A59T, Q61K (C>A), Q61K (C>AA), Q61L, Q61R, Q61H(A>T), Q61H(A>C), K117N(A>C), K117(A>T), A146P, A146V, and A146T), *NRAS* codons 12, 13, 59, 61, 117 and 146 (G12D, G12C, G12S, G12A, G12V, G13D, G13R, G13V, A59T, Q61K, Q61R, Q61L, Q61H(A>C), Q61H(A>T), K117N(G>C), K117N(G>T), A146T and A146V)) and *BRAF* codon 600 (V600E(T>A), V600E(G>AA), V600D, V600K and V600R). A total of 76 assays (26 primary tumors, 16 lymph node metastases and 34 liver metastases) were performed using two kits based on polymerase chain reaction amplification and array hybridization with different probes, following the manufacturer's instructions (CLART® CMA-KRAS-BRAF-PIK3CA and CLART CMA-NRAS-iKRAS kits; Genomica SAU Technology, Madrid, Spain). Estimated sensitivity was 1% as established by the manufacturer.

Patient and public involvement

This study analysed cancer tissues from de-linked database. Therefore, we did not inform or disseminate to patients the research question, the outcome measures and the results. Patients were not involved in the study, including in the design, recruitment and conduct of the study. No patient adviser was included in the contributorship statement.

Statistical methods

Means, standard deviations (SDs) and ranges of continuous variables, and the frequencies and percentages of dichotomous variables were calculated using IBM SPSS for Windows version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Author contributions

MMA, MES, and JMS designed the study; JG, LMB, JAA and MFA provided tumour samples for analysis. MMA, OB, RG and SC participated in the manuscript preparation and carried out the majority of molecular genetic analysis. AO provided expert opinion. SC and JMS wrote the paper.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

FUNDING

This work has been partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain) (PI18/00282), the Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, Valladolid, Spain (GRS1302/A/16), the RTICC of the ISCIII (RD12/0020/0035-FEDER, RD12/0036/0048-FEDER) and CIBERONC (CB16/12/00400 and CB16/12/00233), the Fundación Memoria de Don Samuel Solórzano Barruso (Salamanca, Spain) and the Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, (Madrid, Spain). JM Sayagués and ME Sarasquete are supported by grants (CES11/004 and CP13/00080) from the ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. *Int J Cancer*. 2015; 136:E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
2. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. 2001; 2:533-543. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00486-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00486-7).
3. Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, Siena S, Zhang K, Williams R, Wiezorek J. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol*. 2013; 31:759-765. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.1492>.
4. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: Implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12:594-603. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70209-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70209-6).
5. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Sorich MJ. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015; 112:1888-1894. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.173>.
6. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010; 11:753-762. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70130-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70130-3).
7. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, Frattini M, Riva C, Andreola S, Bajetta E, Bertario L, Leo E, Pierotti MA, Pilotti S. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2009; 20:84-90. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn541>.
8. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, Aranda Aguilar E, Bardelli A, Benson A, Bodoky G, Ciardiello F, D'Hoore A, Diaz-Rubio E, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016; 27:1386-422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>.
9. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008; 359:1757-65. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804385>.
10. Tian S, Simon I, Moreno V, Roepman P, Tabernero J, Snel M, van't Veer L, Salazar R, Bernards R, Capella G. A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. *Gut*. 2013; 62:540-549. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302423>.
11. Losi L, Benhattar J, Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1992; 28A:1115-20.
12. Zauber P, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Bishop DT. Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol*. 2003; 56:137-140.
13. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoal M, François E, Formento P, Renée N, Laurent-Puig P, Chazal M, Benchimol D, Delpero JR, Letoublon C, Pezet D, Seitz JF, Milano G. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:4830-4835. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4906>.
14. Albanese I, Scibetta AG, Migliavacca M, Russo A, Bazan V, To masino RM, Colomba P, Tagliavia M, La Farina M. Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325:784-791.
15. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:790-799. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2446>.

16. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, Winter A, Pickford IR, Birnie GD. Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol.* 1998; 185:130-138.
17. Sayagués JM, Abad Mdel M, Melchor HB, Gutiérrez ML, González-González M, Jensen E, Bengoechea O, Fonseca E, Orfao A, Muñoz-Bellvis L. Intratumoural cytogenetic heterogeneity of sporadic colorectal carcinomas suggests several pathways to liver metastasis. *J Pathol.* 2010; 221:308-319. <https://doi.org/10.1002/path.2712>.
18. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zube A, Celik 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. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091>.
19. Shaib W, Mahajan R, El-Rayes B. Markers of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2013; 4:308-318. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2013.029>.
20. Iwasa Y, Michor F. Evolutionary dynamics of intratumor heterogeneity. *PLoS One.* 2011; 6:e17866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017866>.
21. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell.* 2015; 27:15-26. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.12.001>.
22. Turtoi A, Blomme A, Castronovo V. Intratumoral heterogeneity and consequences for targeted therapies. *Bull Cancer.* 2015; 102:17-23. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2014.12.006>.
23. Normanno N, Rachiglio AM, Lambiase M, Martinelli E, Fenizia F, Esposito C, Roma C, Troiani T, Rizzi D, Tatangelo F, Botti G, Maiello E, Colucci G, Ciardiello F; CAPRI-GOIM investigators. Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Ann Oncol.* 2015; 26:1710-1714. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv176>.
24. Ciardiello F, Normanno N, Maiello E, Martinelli E, Troiani T, Pisconti S, Giuliani F, Barone C, Carteni G, Rachiglio AM, Montesarchio V, Tonini G, Rizzi D, et al. Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: findings from the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol.* 2014; 25:1756-61. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu230>.
25. Brannon AR, Vakiani E, Sylvester BE, Scott SN, McDermott G, Shah RH, Kania K, Viale A, Oschwald DM, Vacic V, Emde AK, Cercek A, Yaeger R, et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol.* 2014; 15:454. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0454-7>.
26. Mao C, Wu XY, Yang ZY, Threapleton DE, Yuan JQ, Yu YY, Tang JL. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. *Sci Rep.* 2015; 5:8065. <https://doi.org/10.1038/srep08065>.
27. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26:1626-1634. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.7116>.
28. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, André T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, Ciuleanu TE, 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. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.6055>.
29. Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JW, Tebar M, Riemersma S, van Krieken JH, Punt CJ, Nagtegaal ID. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2011; 104:1020-1026. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.26>.
30. Jeantet M, Tougeron D, Tachon G, Cortes U, Archambaut C, Fromont G, Karayan-Tapon L. High Intra- and Inter-Tumoral Heterogeneity of RAS Mutations in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016; 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17122015>.
31. Kosmidou V, Oikonomou E, Vlasi M, Avlonitis S, Katseli A, Tsipras I, Mourtzoukou D, Kontogeorgos G, Zografos G, Pintzas A. Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Hum Mutat.* 2014; 35:329-340. <https://doi.org/10.1002/humu.22496>.
32. Miranda E, Bianchi P, Destro A, Morengi E, Malesci A, Santoro A, Laghi L, Roncalli M. Genetic and epigenetic alterations in primary colorectal cancers and related lymph node and liver metastases. *Cancer.* 2013; 119:266-276. <https://doi.org/10.1002/encr.27722>.
33. Wu X, Northcott PA, Dubuc A, Dupuy AJ, Shih DJ, Witt H, Croul S, Bouffét E, Fults DW, Eberhart CG, Garzia L, Van Meter T, Zagzag D, et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature.* 2012; 482:529-533. <https://doi.org/10.1038/nature10825>.
34. Loes IM, Immervoll H, Sorbye H, Angelsen JH, Horn A, Knappskog S, Lønning PE. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA, TP53 status and intraindividual mutation heterogeneity on outcome after liver resection for colorectal

- cancer metastases. *Int J Cancer*. 2016; 139:647-656. <https://doi.org/10.1002/ijc.30089>.
35. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002; 418:934.
 36. The International Agency for Research on Cancer. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. WHO Classification of Tumours, 3rd Edition, Volume 2. Hamilton SR, Aaltonen LA (eds). 2006; 16:8-3.
 37. International Union Against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (eds). 2002; 10.

Spatio-temporal tumor heterogeneity in metastatic CRC tumors: a mutational-based approach

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Table 1: Clinical and biological characteristics of sporadic colorectal cancer (sCRC) patients (n=26)

Clinical Features	Total (n=26)
Age (years)*	67 (48-79)
Gender	
Female	7 (27%)
Male	19 (73%)
Site of primary tumor	
Right colon	4 (16%)
Left colon	11 (42%)
Rectum	11 (42%)
Histological type	
Adenocarcinoma	25 (96%)
Adenocarcinoma with signet ring cells	1 (4%)
Grade of differentiation	
Well-differentiated	16 (61%)
Moderately differentiated	8 (31%)
Poorly differentiated	2 (8%)
Histopathological tumor classification	
pT2	1 (4%)
pT3	19 (73%)
pT4	6 (23%)
Histopathological lymph node status	
pN0	9 (35%)
pN1	11 (42%)
pN2	6 (23%)
Metastatic status	
M0	6 (23%)
M1	20 (77%)
Stage at diagnosis	
Stage I	1 (4%)
Stage IIA	1 (4%)
Stage IIB	1 (4%)
Stage IIIB	3 (11%)
Stage IV	20 (77%)
Tumor size (cm)*	5.3 (2.5-9)
CEA serum levels*	204 (0.8-1484)
≤5 ng/ml	4 (15%)
>5 ng/ml	22 (85%)

*Results expressed as median (range), or number of cases (percentage).

CEA: carcinoembryogenic antigen.

3. Artículo 3: “Implicaciones pronósticas de la expresión proteica de EGFR en CCR y su correlación con el número de copias del gen, niveles de ARNm y regulación de la expresión por miARN”

OBJETIVOS: El cáncer colorrectal (CCR) esporádico es la tercera neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en todo el mundo y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer. La mayoría de estas muertes son causadas por la diseminación metastásica del tumor primario (principalmente al hígado). Recientes estudios genéticos sugieren que el potencial metastásico radica en el propio tumor primario. Sin embargo, estos hallazgos aún no han sido confirmados a nivel genómico mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), técnica que habitualmente se utiliza para la clasificación pronóstica del CCR esporádico. El objetivo de este estudio fue explorar el impacto pronóstico de los marcadores de IHQ que típicamente se usan en la rutina para el diagnóstico de CCR esporádico.

MATERIAL Y MÉTODOS: Analizamos el valor pronóstico de la expresión de las proteínas alteradas más frecuentemente en los carcinomas colorrectales esporádicos de 51 pacientes con CCR (25 tumores que desarrollaron metástasis hepáticas y 26 tumores no metastásicos, con una mediana de seguimiento de 103 meses) utilizando técnicas de IHQ. Además, en todos los casos evaluamos la expresión y la regulación del gen EGFR empleando arrays de alta densidad (ARNm y miARNs). Para los estudios de del número de copias (CNV) del gen EGFR, se utilizaron arrays de SNPs de 500K y técnicas de FISH.

RESULTADOS: Las únicas diferencias estadísticamente significativas encontradas en la expresión IHQ entre CCR metastásicos y no metastásicos fueron para MLH1 ($p = 0.05$), PMS2 ($p = 0.02$), CEA ($p < 0.001$) y EGFR ($p < 0.001$). La expresión de la proteína EGFR se asoció con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos ($p = 0,001$), metástasis hepáticas en el momento del diagnóstico ($p < 0,001$) y estadios avanzados de la enfermedad ($p < 0,001$). Además, encontramos una asociación

significativa entre la positividad IHQ de EGFR con el número de copias del gen EGFR, determinado por FISH y arrays de SNPs, así como con niveles de ARNm de EGFR, detectados por arrays de oligonucleótidos. Al mismo tiempo, confirmamos observaciones previas sobre miARNs candidatos de la regulación de la expresión de EGFR, identificando interacciones potenciales de dos miARNs, miR-134 y miR-4328, que podrían estar implicados en la regulación de la expresión de EGFR en tumores no metastásicos y metastásicos, respectivamente. La expresión de EGFR ($p = 0,005$) se asoció con un pronóstico significativamente peor. El análisis multivariante de factores pronósticos para la supervivencia global (SG) mostró la expresión de EGFR ($p=0.047$) y el estadio pTNM ($p<0.001$) como factores pronósticos independientes.

CONCLUSIONES: En general, nuestros resultados muestran que la expresión de la proteína EGFR y el número de copias de EGFR estaban estrechamente relacionados entre sí. La expresión de EGFR podría estar regulada por mecanismos de amplificación o polisomías, observado con mayor frecuencia en tumores metastásicos, o por miARNs (miRNA-134) en tumores no metastásicos. También mostramos que la expresión IHQ de EGFR y el número de copias de EGFR están estrechamente relacionados. La expresión de EGFR en pacientes con CCR parece estar relacionada con un mayor potencial metastásico y menor supervivencia, lo que proporciona información pronóstica adicional al estadio pTNM.

Clinicopathological features and prognostic implications of EGFR protein expression in sporadic colorectal tumors: Correlation with copy number status, mRNA levels and miRNAs regulation

By Sofía del Carmen, Luís Antonio Corchete, Ruth Gervas, Alba Rodríguez-Carreño, María García-Muñoz, José Antonio Álcazar, Jacinto García, Oscar Bengochea, María Eugenia Sarasquete, Luis Muñoz Bellvis, José María Sayagués and Mar Abad

Abstract: Sporadic colorectal cancer (sCRC) is the third most frequently diagnosed cancer worldwide and is the second most frequent cause of cancer-related deaths. Metastatic dissemination of the primary tumor (i.e., mostly liver metastasis) is the main cause of death of sCRC patients. We investigated the prognostic value of the expression of the most frequently altered proteins in primary colorectal carcinomas from 51 sCRC patients (25 liver metastatic and 26 non-metastatic tumors) with a long median follow-up (103 months) using immunohistochemistry (IHC) techniques. We also evaluated the expression and regulation of the *EGFR* gene using mRNA and miRNA genes by high-throughput arrays. For studies of copy number alteration (CNA) of the *EGFR* gene, 500K SNP arrays and FISH techniques were used. The only statistically significant differences found between liver metastatic and non-metastatic sCRCs were those involving antibodies to MLH1 ($p=0.05$), PMS2 ($p=0.02$), CEA ($p<0.001$) and EGFR ($p<0.001$). EGFR protein expression was associated with the presence of lymph node metastases ($p=0.001$), liver metastases at diagnosis ($p<0.001$), and advanced stages of the disease ($p<0.001$). In addition, there was a significant association between EGFR IHC positivity, EGFR gene copy number, determined by FISH techniques

SPORADIC COLORECTAL CANCER (sCRC) is the third most frequently diagnosed cancer worldwide and is the second most common cause of cancer-related deaths [1,2]. Approximately 300,000 new cases of sCRC are reported each year and 200,000 (67%) of these patients die from sCRC-related complications. Metastatic dissemination of the primary tumor, mostly liver metastasis, is the main cause of death of sCRC patients [3]. It has long been believed that the genetic/biological markers associated with the ability of sCRC to invade distant tissues already reside within primary tumor cells [4,5]. Determining the markers that would help identify patients who are at risk of harboring or developing metastases could contribute significantly to the development of new strategies for the diagnosis and management of the disease.

We and others have recently shown that metastatic sCRC-specific genomic alterations, such as del(17p) and del(22q), are shared by primary tumors and their paired liver metastatic samples [5-8], but are absent from non-metastatic sCRC tumors [6]. Notably, such genomic alterations of sCRC are closely associated with

and SNP arrays, and EGFR mRNA levels, detected by oligonucleotide arrays between metastatic and non-metastatic CRC cases. At the same time, we confirmed and extended previous observations about the candidate miRNAs targeting EGFR expression, identifying potential interactions of two miRNAs, miR-134 and miR-4328, in non-metastatic and metastatic tumors, respectively. The expression of EGFR ($p=0.005$) was associated with a significantly worse outcome. Multivariate analysis of the prognostic factors for overall survival identified two independent variables that predicted an adverse outcome, the expression of EGFR ($p=0.047$) and pTNM stage ($p<0.001$). Overall, our results show that EGFR protein expression and EGFR copy number were closely related to each other. The *EGFR* expression could be regulated by amplification mechanisms or high levels of polysomy, which are frequently observed in metastatic tumors, or by miRNAs (i.e., miRNA-134) in non-metastatic tumors. We also showed that the possible involvement of EGFR expression in sCRC patients with liver metastasis appears to be intrinsically related to increased metastatic potential and poor outcome, providing additional prognostic information about the pTNM stage.

unique gene expression profiles (GEPs) [9]. Despite the exceptional utility of genomic methods in the discovery phase of experimentation, their use is limited in most hospitals since they are expensive techniques and difficult to apply in paraffin-embedded material. For these reasons, in practice, most routine diagnoses are performed using immunohistochemistry (IHC) techniques. These drawbacks hinder the clinical implementation of new disease biomarkers. In this context, IHC is an important technique for biomarker validation for several reasons: i) it allows direct visualization of biomarker expression in histologically important regions of the examined tissue; ii) clinical laboratories typically perform IHC on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections processed by standard methods, potentially making hundreds of millions of specimens available for study [10]; and iii) validated IHC assays may be readily introduced into clinical practice.

Nevertheless, the development of miRNA technology and deep-sequencing techniques has provided tools for the detection and discovery of regulatory RNA molecules [11]. Several miRNA

registry databases (miRDB v21, TargetScan 7.2, miRWalk 3, and miRTarBase 7.0) feature details of more than 2000 human miRNA genes, of which 134 were predicted to be potential regulators of EGFR expression. In this study, we searched the miRDB v21 database (<http://www.mirdb.org>) for candidate miRNAs that regulate EGFR expression, and examined whether the predicted miRNA regulators of EGFR displayed expression levels that were inversely correlated with expression levels of the EGFR gene. We identified EGFR as a potential target of miRNA-134 and miRNA-4328, for non-metastatic and metastatic tumors, respectively.

In the present study, we used IHC techniques to investigate the prognostic value of the expression of the proteins most frequently altered in primary colorectal carcinomas from 51 sCRC patients (25

liver metastatic and 26 non-metastatic tumors) with a long median follow-up. We also analyzed the expression and regulation of the EGFR gene by mRNA and miRNA genes using high-throughput arrays. Copy number alteration (CNA) of the EGFR gene was examined using 500K SNP arrays and FISH techniques. Overall, our study revealed that EGFR protein expression and copy number are closely related and that EGFR expression, as shown by IHC, is an independent prognostic factor of overall survival (OS) in sCRC patients.

This work has been partially supported by grants from the Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, Valladolid, Spain (GRS1302/A/16), and the Fundación Memoria de Don Samuel Solórzano Barruso, Salamanca, Spain

PATIENTS AND SAMPLES

Tissue specimens from 51 sCRC patients who had undergone surgical resection of primary tumor tissues between June 2000 and September 2007 in the Department of Surgery of the University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, were included in the study, prior to any cytotoxic therapy being given.

In all cases, tumor diagnosis and classification were performed according to the criteria of the AJCC [12]. The median follow-up at the moment of closing the study was 103 months (range: 1–172 months). About half the patients (n=25; 49%) developed liver metastases during the first 8 months after colorectal surgery (n=16), or later, during follow-up (n=9). The other 26 patients (51%) were non-metastatic sCRC cases, selected on the basis of the absence of metastatic dissemination after a minimum follow-up of 5 years. Patient clinical, laboratory and follow-up data are summarized in Table 1.

The study was approved by the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca, and informed consent was given by each participant before entering the study.

Tissue microarray (TMA.) Paraffin blocks containing formalin-fixed primary tumors were obtained from all patients. In each case, a 0.6-mm diameter core biopsy was taken from the tumor in the paraffin blocks using a tissue microarray instrument. Tissue cores from each specimen were assembled on recipient paraffin blocks and embedded. Two colon cancer TMAs were prepared using a Beecher MTA-1 Manual Tissue Microarrayer, incorporating tissue selected by a pathologist from histological sections. One TMA contained samples from metastatic tumors and the other contained non-metastatic cases. Cores of normal tissue were added and all tumor samples were included in triplicate in both TMAs.

Immunohistochemistry. We performed immunohistochemical staining on 4- μ m-thick sections of the TMA blocks. Paraffin sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol. Microwave-induced antigen retrieval was performed in 0.01 M citrate buffer, pH 6.0. Endogenous peroxidase activity was blocked using 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 15 min. Antibodies and reagents were included automatically using the Leica BOND-III processor (A. Menarini Diagnostics, San Diego, CA), following previously published standard protocols [13]. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Primary antibodies, dilutions, manufacturers and interpretations are specified in Supplementary Table 1.

FISH analysis. Separate FISH analyses were performed for each TMA, one containing samples from metastatic tumors and the other from non-metastatic cases. The TMA slides were preheated at 60°C overnight, then deparaffinized in xylene and ethanol. The slides were submerged in Vysis Paraffin Pretreatment Reagent (Vysis; Downers Grove, IL) for 13 min at 80°C in a waterbath. After the sections had been rinsed with deionized water, the slides were treated with protease solution (250 mg pepsin + 62.5 ml 0.2 N HCl, pH 1.0) for 13 min at 37°C in a waterbath. After rinsing and air-drying, 20 μ l of probe was applied to each TMA slide. A set of two probes (LSI-EGFR, spectrum orange; CEP-7, spectrum green) (Vysis Inc., Downers Grove, IL) was used. The slides were coverslipped and sealed with rubber cement, denatured for 5 min at 75°C, and then hybridized overnight at 37°C. Denaturation and hybridization were performed in a Hybrite thermocycler (Vysis). For post-hybridization washing, the slides were immersed in 2 X SSC with 0.3% NP-40 at 73°C in a waterbath for 1 min. The TMA slides were air-dried in the dark, then counterstained with 20 μ l of

DAPI (Sigma, St. Louis, MO). 5 μ l of Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used as an antifading agent. The number of hybridization spots per nuclei of ≥ 200 cells per sample was quantified using a BX60 fluorescence microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a 100 \times oil objective. *EGFR* gene amplification was defined as an *EGFR/CEP7* ratio ≥ 2 , in accordance with the manufacturer's recommendations.

Identification of copy number alterations by SNP arrays. Data from two 250-K Affymetrix SNP mapping arrays (NspI and StyI SNP arrays; Affymetrix, Santa Clara, CA) previously reported by us [8] were used to analyze *EGFR* CNAs. The *aroma.affymetrix* algorithm was used, following the CRMA version 2 method in R, as described elsewhere [14] (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; available at: <http://www.aroma-project.org>, accessed 18 March 2014). The array normalization steps we used have been described by Munoz-Bellvis *et al.* [15]. Data from the 250-K StyI and 250-K NspI arrays were then integrated into a single database, and raw copy number values were calculated as transformed \log_2 values of the following ratios calculated for each patient: group 1 primary tumor=normal PB, group 2 primary tumor=normal PB, and group 1 primary tumor=group 2 primary tumor.

The criteria used to define single-point copy number changes in the *EGFR* gene were based on values of $p < 0.01$ for at least seven markers per DNA segment, and median segment values were assigned to each probe using smoothed values. For the identification of CNAs (gains or losses), a threshold was established based on the changes observed in the fluorescence intensity of sequential DNA segments for primary tumor *versus* PB (\log_2 ratio cutoff values of >0.09 and <20.09 for gains and losses, respectively). Moderated t tests were used to identify significant differences in copy numbers between metastatic and non-metastatic samples (FDR-corrected $p < 0.05$).

Gene expression profile microarray studies.

Data from two expression arrays, Affymetrix PrimeView Human Gene Expression and the microRNA 3.0 Expression arrays (Santa Clara, CA), previously reported by us [16] were used to analyze *EGFR* expression. Raw GEP data were obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database with accession number GSE81582. The data are based on sets of 49,395 and 5,683 probes for the Affymetrix PrimeView Human Gene Expression microarray and the microRNA 3.0 microarray, respectively. For data analysis, raw GEP data were normalized with the Robust Multi-array Average (RMA) algorithm, which includes sequential background correction, intra- and inter-microarray well normalization, probe set summarization and calculation of expression signals [17]. Unsupervised

classification of samples and the *EGFR* gene was performed by multi-dimensional scaling (MDS) and hierarchical clustering analysis (HCA) based on the expression signal detected for each gene of each probe set, using Simfit statistical software (<http://www.simfit.org.uk>). Clustering was carried out using Euclidean distances and the linkage method group average. Genes differentially expressed (miRNA and mRNA) between tumoral and non-tumoral samples were identified by supervised two-class unpaired significance analysis of microarray (SAM) [18] based on a q-value cut off of ≤ 0.01 and an absolute ≥ 2.0 -fold change cutoff.

miRNA candidates acting as regulators of the *EGFR* gene in colorectal samples were identified by Pearson correlation analysis, which determined the significant associations between deregulated miRNA and *EGFR* gene transcripts in primary colorectal tumors, compared with non-tumoral colorectal tissue. The *psych* R-package, based on an adjusted FDR of ≤ 0.05 was used. We analyzed 134 candidate miRNAs targeting *EGFR* expression predicted from the miRDB database. Each potential miRNA-mRNA interaction identified was subsequently evaluated against databases of experimentally validated miRNA interactions (TarBase 8.0 and miRWalk-database) and miRNA target prediction tools (DIANA-microT-CDS v5.0, miRWalk-database, TargetScanHuman and miRecords) [19, 20].

Mutation analyses using low-density microarray technology.

After histopathological diagnosis, each tumor was tested for mutations of the *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes using a multiplex allele-specific PCR-based assay that assesses 44 mutations in *KRAS* codons 12, 13, 59, 61, 117 and 146 (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D, A59E, A59G, A59T, Q61K (C>A), Q61K (C>AA), Q61L, Q61R, Q61H (A>T), Q61H (A>C), K117N (A>C), K117(A>T), A146P, A146V, and A146T), *NRAS* codons 12, 13, 59, 61, 117 and 146 (G12D, G12C, G12S, G12A, G12V, G13D, G13R, G13V, A59T, Q61K, Q61R, Q61L, Q61H (A>C), Q61H (A>T), K117N (G>C), K117N (G>T), A146T and A146V) and *BRAF* codon 600 (V600E(T>A), V600E (G>AA), V600D, V600K and V600R). 51 assays were performed using two kits based on PCR amplification and array hybridization with various probes, following the manufacturer's instructions (CLART[®] CMA *KRAS* *BRAF* and CLART[®] CMA *NRAS* i*KRAS* kits; Genomica SAU Technology, Madrid, Spain).

Statistical analyses. The mean, standard deviation (SD) and range of all continuous variables were calculated in SPSS v.22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA); dichotomous variables were reported as frequencies and percentages. To evaluate the statistical significance of group differences, unpaired Student's t and Mann-Whitney U tests were used for normally and non-

normally distributed continuous variables, respectively. For dichotomous variables, the χ^2 test was used. Overall survival (OS) curves were plotted according to the Kaplan–Meier method, and the log-rank test (one-sided) was used to determine the statistical significance of the differences between survival curves. Prognostic factors for OS were identified by multivariate stepwise Cox regression, using forward selection, and considering only those variables that showed a significant association with OS in the univariate analysis. Statistical significance was concluded for values of p (or, where appropriate, Pearson-corrected p) <0.05 .

RESULTS

1. Patient characteristics. Overall, 51 patients diagnosed with sCRC at the University Hospital of Salamanca (38 males and 13 females; median age of 67 years, ranging from 38 to 83 years) were studied. Histologically, all cases were adenocarcinomas. By tumor grade, 35, 14 and 2

cases were classified as well, moderately and poorly differentiated carcinomas, respectively. In all cases, histopathological grade was systematically confirmed in a second, independent evaluation by another experienced pathologist. The most relevant clinical and laboratory data for each individual sCRC patient studied are summarized in Table 1.

All patients underwent complete surgical tumor resection (R0). sCRC cases with liver metastases were most frequently located in the rectum ($p=0.02$), and tended to show a higher frequency of lymph node metastases ($p<0.001$) and abnormally higher CEA serum levels ($p<0.001$) than non-metastatic patients (Table 1). From the prognostic point of view, sCRC with liver metastases also had a higher frequency of deaths associated with significantly shortened patient OS (median, 30 vs. 100 months, respectively; $p<0.001$). By contrast, no significant differences were found between liver metastatic and non-metastatic CRC cases with respect to patient age, gender and histological grade (Table 1).

Table 1. Clinical and biological characteristics of patients with metastatic (n=25) and non-metastatic (n=26) sporadic colorectal cancer (sCRC) at diagnosis.

Variable	Non-metastatic sCRC (n=26)	Metastatic sCRC (n=25)	<i>p</i>	Total (n=51)
Age (years)*	67 (38-83)	67 (48-79)	NS	67 (38-83)
Gender				
Female	7 (27%)	6 (24%)	NS	13 (25%)
Male	19 (73%)	19 (76%)		38 (75%)
Site of primary tumor				
Right colon	9 (35%)	4 (16%)		13 (26%)
Left colon	14 (54%)	10 (40%)	0.020	24 (47%)
Rectum	3 (11%)	11 (44%)		14 (27%)
Histopathological grade				
Well differentiated	19 (73%)	16 (64%)	NS	35 (69%)
Moderately differentiated	6 (23%)	8 (32%)		14 (27%)
Poorly differentiated	1 (4%)	1 (4%)		2 (4%)
Histopathological tumor classification				
pT1	1 (4%)	0 (0%)		2 (4%)
pT2	6 (23%)	1 (4%)	0.060	6 (11%)
pT3	11 (42%)	19 (76%)		30 (59%)
pT4	8 (31%)	5 (20%)		13 (26%)
Lymph node involvement				
pN0	26 (100%)	9 (36%)		35 (69%)
pN1	0 (0%)	11 (44%)	<0.001	11 (21%)
pN2	0 (0%)	5 (20%)		5 (10%)
TNM stage at diagnosis				
I	6 (23%)	1 (4%)		7 (14%)
IIA	1 (4%)	2 (8%)		3 (6%)
IIB	17 (65%)	0 (0%)		17 (33%)
IIIA	0 (0%)	0 (0%)	<0.001	0 (0%)
IIIB	2 (8%)	1 (4%)		3 (6%)
IIIC	0 (0%)	1 (4%)		1 (2%)
IV	0 (0%)	20 (80%)		20 (39%)
CEA serum levels*	4.18 (0.60-17.96)	269.22 (0.84-1484)	<0.001	118.63 (0.60-1484)
Number of deaths**	2 (8%)	13 (72%)	<0.001	15 (34%)
OS (months)**	99.69 (71-124)	31.61 (7-96)	<0.001	71.84 (7-124)

Results expressed as number of cases (percentage), except * as median (range). ** survival rate calculated for 44 patients (26 non-metastatic and 18 metastatic). CEA: carcinoembryogenic antigen; OS: overall survival; NS, no statistically significant differences found between groups ($p>0.05$).

2. Immunohistochemistry. All tumors were positive for CK20 and CDX2, confirming their enteric origin. For most primary antibodies analyzed, sCRC with liver metastases had similar expression profiles to those of non-metastatic tumors; this included similar ($p>0.05$) levels of expression of MSH2, MSH6, c-Myc, Her2, p53, β -catenin, and Ki-67 antibodies (Table 2). The only statistically significant differences found between liver metastatic and non-metastatic sCRCs were

those involving antibodies MLH1 ($p=0.05$), PMS2 ($p=0.02$), CEA ($p<0.001$) and EGFR ($p<0.001$). All cases showing loss of MLH1 (20% of cases) and PMS2 (25%) expression, and absence of CEA expression (22% of cases) were non-metastatic tumors; most liver metastatic tumors had a positive value of EGFR membranous expression (79% vs. 38% of non-metastatic cases). It should be noted that none of the non-metastatic tumors showed $\geq 35\%$ positivity for EGFR antibody (Table 2)

Table 2. Immunohistochemical expression in patients with metastatic (n=25) and non-metastatic (n=26) sporadic colorectal cancer (sCRC) at diagnosis.

Marker	Non-metastatic sCRC (n=26)	Metastatic sCRC (n=25)	<i>P</i>	Total (n=51)
MLH1				
Loss	5 (20%)	0 (0%)	0.050	5 (10%)
Normal	20 (80%)	25 (100%)		45 (90%)
PMS2				
Loss	6 (25%)	0 (0%)	0.020	6 (14%)
Normal	18 (75%)	18 (100%)		36 (86%)
MSH2				
Loss	2 (8%)	0 (0%)	NS	2 (4%)
Normal	22 (92%)	23 (100%)		45 (96%)
MSH6				
Loss	2 (8%)	0 (0%)	NS	2 (4%)
Normal	23 (92%)	24 (100%)		47 (96%)
c-Myc				
<10%	2 (8%)	7 (29%)	NS	9 (19%)
$\geq 10\%$	22 (92%)	17 (71%)		39 (81%)
Her2				
0/1+	26 (100%)	23 (96%)	NS	49 (98%)
2+	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)
3+	0 (0%)	1 (4%)		1 (2%)
p53				
0	6 (23%)	7 (29%)	NS	13 (26%)
<10%	9 (35%)	6 (35%)		15 (30%)
$\geq 10\%$	11 (42%)	11 (46%)		22 (44%)
β-catenin				
Negative	18 (69%)	11 (46%)	NS	29 (58%)
Positive	8 (31%)	13 (54%)		21 (42%)
CEA				
Negative	11 (22%)	0 (0%)	<0.001	11 (22%)
Positive	15 (88%)	24 (100%)		39 (78%)
EGFR				
0	16 (62%)	5 (21%)	<0.001	21 (42%)
1-10%	4 (15%)	1 (4%)		5 (10%)
10-35%	6 (23%)	4 (17%)		10 (20%)
$>35\%$	0	14 (58%)		14 (28%)
Ki-67				
<50%	15 (58%)	19 (83%)	NS	34 (69%)
$\geq 50\%$	11 (42%)	4 (17%)		15 (31%)

Results expressed as number of cases (percentage); CEA: carcinoembryogenic antigen; NS: no statistically significant differences found between groups ($p>0.05$).

3. Association between the immunohistochemical profile of sCRC tumors and other features of the disease. Expression of EGFR $>35\%$ was associated with the presence of lymph node metastases ($p=0.001$), liver metastases at diagnosis ($p<0.001$), advanced stages of the disease ($p<0.001$) and *KRAS* mutations ($p=0.001$). In contrast, β -catenin expression was significantly

associated with microsatellite instability ($p=0.007$) and *NRAS* mutations ($p=0.01$). In turn, patients who displayed moderate or intense positivity for CEA antibody were more frequently associated with localization in the rectum ($p=0.03$), advanced stages (stage IV; $p=0.007$), presence of lymph node metastases ($p=0.01$), liver metastases ($p=0.003$) and *BRAF* mutations ($p=0.008$). As

Table 3. Expression of EGFR, β -catenin, CEA, e-Myc and Ki-67 antibodies and their association with other clinical, biological, histopathological and genetic features of sporadic colorectal cancer patients (n=51).

Variable	EGFR		P	β -catenin		P	CEA		P	e-Myc		P	Ki-67		P
	<35%	$\geq 35\%$		-	+		-	+		<10%	$\geq 10\%$		<50%	$\geq 50\%$	
Age (years)															
<72	21 (78)	6 (22)	NS	15 (55)	12 (45)	NS	5 (19)	22 (81)	NS	6 (22)	21 (78)	NS	20 (74)	7 (26)	NS
≥ 72	15 (65)	8 (35)		14 (61)	9 (39)		6 (26)	17 (74)		3 (17)	18 (83)		15 (65)	8 (35)	
Gender															
Male	25 (68)	12 (32)	NS	23 (62)	14 (38)	NS	9 (24)	28 (76)	NS	7 (19)	29 (81)	NS	24 (65)	13 (35)	NS
Female	11 (85)	2 (15)		6 (46)	7 (54)		2 (15)	11 (85)		2 (17)	10 (83)		11 (85)	2 (15)	
Site of primary tumor															
Colon	28 (76)	9 (24)	NS	22 (59)	15 (41)	NS	11 (30)	26 (70)	NS	5 (14)	31 (86)	NS	25 (68)	12 (32)	NS
Rectum	8 (62)	5 (38)		7 (46)	6 (54)		0 (0)	13 (100)		4 (33)	8 (67)		10 (77)	3 (23)	
Histopathological grade															
Well differentiated	24 (71)	10 (39)	NS	20 (59)	14 (41)	NS	7 (21)	27 (79)	NS	7 (21)	26 (79)	NS	21 (62)	13 (38)	NS
Moderately differentiated	11 (79)	3 (21)	NS	8 (57)	6 (43)	NS	4 (29)	10 (71)	NS	2 (14)	12 (86)	NS	12 (86)	2 (14)	NS
Poorly differentiated	1 (50)	1 (50)		1 (50)	1 (50)		0 (0)	2 (100)		0 (0)	1 (100)		2 (100)	0 (0)	
pT stage															
T1-T2	8 (100)	0	NS	3 (38)	5 (62)	NS	3 (38)	5 (62)	NS	0 (0)	8 (100)	NS	5 (62)	3 (38)	NS
T3-T4	28 (67)	14 (33)		16 (38)	26 (62)		8 (19)	34 (81)		9 (22)	31 (88)		30 (71)	12 (29)	
Lymph node involvement															
N0	30 (86)	5 (14)	0.001	21 (62)	13 (38)	NS	11 (44)	24 (56)	NS	5 (15)	28 (85)	NS	24 (69)	11 (31)	NS
N1/N2	6 (40)	9 (60)		8 (50)	8 (50)		0 (0)	15 (100)		4 (27)	11 (73)		11 (73)	4 (27)	
Liver metastases at diagnosis															
No	29 (94)	2 (6)	<0.001	19 (63)	11 (37)	NS	11 (35)	20 (65)	NS	3 (10)	26 (90)	NS	19 (61)	12 (39)	NS
Yes	7 (37)	12 (63)		10 (50)	10 (50)		0 (0)	19 (100)		6 (32)	13 (68)		6 (31)	13 (69)	
pTNM stage at diagnosis															
I	7 (100)	0		2 (29)	5 (71)		3 (43)	4 (57)		0 (0)	7 (100)		4 (57)	3 (43)	
II	19 (95)	1 (5)		15 (79)	4 (21)		6 (30)	14 (70)		2 (11)	16 (89)		12 (30)	18 (70)	
III	3 (75)	1 (25)	<0.001	2 (50)	2 (50)	NS	2 (50)	2 (50)	NS	1 (25)	3 (75)	0.030	3 (75)	1 (25)	NS
IV	7 (37)	12 (63)		10 (50)	10 (50)		0 (0)	19 (100)		6 (31)	13 (69)		16 (84)	3 (16)	
Tumor size															
<4 cm	8 (80)	2 (20)	NS	5 (50)	5 (50)	NS	0 (0)	10 (100)	NS	2 (20)	8 (80)	NS	9 (90)	1 (10)	NS
≥ 4 cm	28 (70)	12 (30)		24 (60)	16 (40)		11 (28)	29 (72)		7 (18)	31 (82)		26 (65)	14 (35)	
Microsatellite instability															
No	27 (66)	14 (34)	NS	20 (49)	21 (51)	NS	4 (10)	37 (90)	NS	9 (23)	30 (77)	NS	32 (78)	9 (22)	NS
Yes	8 (100)	0		8 (100)	0 (0)		8 (100)	0 (0)		0 (0)	8 (100)		3 (37)	5 (63)	0.030
KRAS mutation															
No	35 (78)	10 (22)	0.001	26 (58)	19 (42)	NS	11 (24)	34 (76)	NS	7 (16)	36 (84)	NS	31 (69)	14 (31)	NS
Yes	0	4 (100)		3 (75)	1 (25)		0 (0)	4 (100)		2 (50)	2 (50)		3 (75)	1 (25)	
APCAS mutation															
No	33 (75)	11 (25)	NS	18 (53)	16 (47)	NS	10 (23)	34 (77)	NS	8 (19)	34 (81)	NS	30 (68)	14 (32)	NS
Yes	2 (50)	2 (50)		0 (0)	4 (100)		1 (25)	3 (75)		0 (0)	4 (100)		3 (75)	1 (25)	
BRCA1 mutation															
No	31 (89)	4 (11)	NS	26 (58)	19 (42)	NS	8 (18)	37 (82)	NS	8 (20)	31 (80)	NS	33 (73)	12 (28)	0.040
Yes	4 (100)	0		1 (25)	3 (75)		3 (75)	1 (25)		1 (25)	3 (75)		1 (25)	3 (75)	

Results expressed as number of cases (percentage); CEA: carcinoembryogenic antigen; NS: no statistically significant differences found between groups (p> .05).

shown in Table 3, c-Myc expression was significantly associated with advanced stages (stage IV; $p=0.03$), while patients showing Ki-67 expression were significantly more likely to exhibit microsatellite instability ($p=0.03$) and BRAF mutation ($p=0.04$) than those without such expression.

4. Impact of immunohistochemical profile on patient overall survival. EGFR expression was

associated with a significantly worse outcome ($p=0.005$; Figure 1 and Table 4). Advanced TNM stage ($p<0.001$) and CEA serum levels greater than 5 ng/ml ($p=0.008$) were also associated with an adverse impact on patient OS (Table 4).

Multivariate analysis of the prognostic factors for OS revealed two variables that independently predicted an adverse outcome: EGFR expression ($p=0.047$) and pTNM stage ($p<0.001$).

Figure 1. Overall survival of sCRC patients stratified according to IHC EGFR expression (n=49).

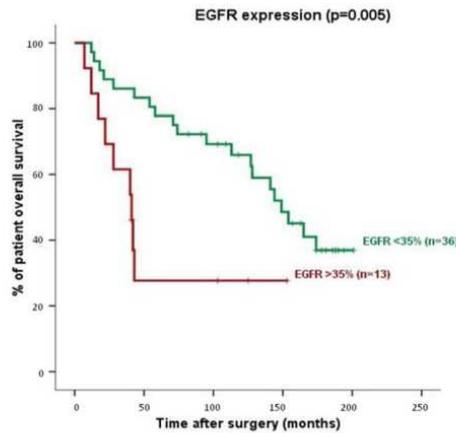


Figure 2. Copy number alterations (CNAs) and EGFR gene expression levels detected in primary tumors from patients with metastatic and non-metastatic sCRC. CNA status assessed by Affymetrix 500K single nucleotide polymorphism (SNP) array platform (panel A) and FISH techniques [probes for the identification of chromosome 7 centromere (7p11; green spots) and EGFR gene (7p11.2; red spots)] (panel B). EGFR gene expression profile analyzed by oligonucleotide arrays (Affymetrix PrimeView Human Gene Expression microarray) (panel C) and immunostaining techniques (20x) (panel D).

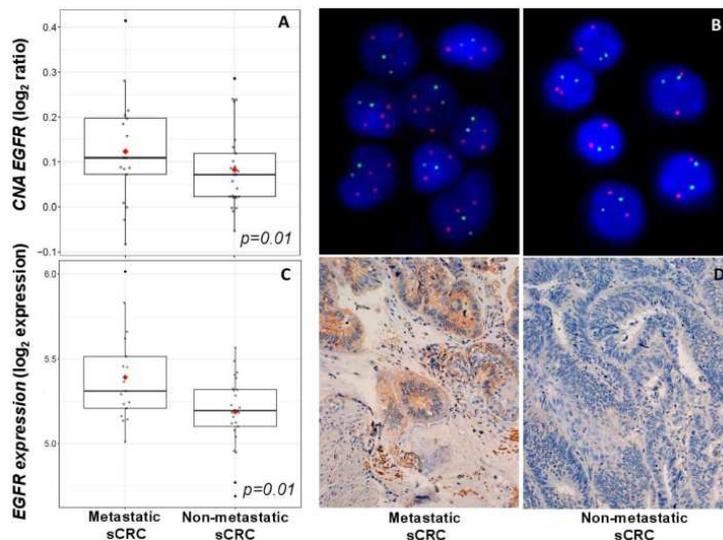


Table 4. Clinical, biological and immunohistochemical characteristics of sporadic colorectal cancer patients (n=50) and their association with overall survival.

Variable	N	Univariate analysis	Multivariate analysis	HR (95% CI)
Age				
<72 years	28 (55%)	NS		
≥72 years	23 (45%)			
Gender				
Male	38 (76%)	NS		
Female	13 (25%)			
Site of primary tumor				
Colon	37 (73%)	NS		
Rectum	14 (27%)			
TNM stage at diagnosis				
Stage I/II	27 (53%)	p<0.001	p<0.001	0.096 (0.039-0.237)
Stage III	4 (8%)			
Stage IV	19 (39%)			
Tumor size				
<4 cm	10 (20%)	NS		
≥4 cm	41 (80%)			
CEA serum levels				
<5 ng	21 (48%)	0.008	NS	
≥5 ng	23 (52%)			
Microsatellite instability				
No	42 (84%)	NS		
Yes	8 (16%)			
EGFR				
<35%	36 (73%)	0.005	0.047	3.2 (1.013-10.02)
≥35%	13 (27%)			
β-catenin				
Negative	29 (58%)	NS		
Positive	21 (42%)			
CEA				
Negative	11 (22%)	NS		
Positive	39 (78%)			
c-Myc				
<10%	9 (19%)	NS		
≥10%	39 (81%)			
Her2				
Negative	49 (98%)	NS		
3+	1 (2%)			
Ki-67				
<50%	34 (69%)	NS		
≥50%	15 (31%)			
p53				
0	13 (26%)	NS		
<10%	15 (30%)			
≥10%	22 (44%)			

Results expressed as number of cases (percentage). NS: not statistically significant ($p>0.05$). HR: hazard ratio.

5. EGFR protein expression and copy number. There was a significant association between EGFR IHC positivity, EGFR gene copy number, as determined by FISH, and SNP arrays and CEP, detected by oligonucleotide arrays, between metastatic and non-metastatic CRC cases (Figure 2) and the whole series (Table 5 and Figure 3). Most tumors with a low level of EGFR IHC expression (<35%) were disomic (75% of cases, as revealed by FISH), had a normal profile (68% of cases, demonstrated by SNP arrays) and a low level of expression of EGFR mRNA determined by oligonucleotide arrays (<4 log₂ expression; 55% of cases), whereas all tumors with EGFR IHC overexpression (≥35%) showed amplifications (57%) or a high proportion of polysomies (43%) with FISH, and most exhibited EGFR gains (71%) in the SNP analysis. In addition, all tumors with a high degree of EGFR IHC positivity (≥35%) were overexpressed in oligonucleotide arrays (>4 log₂ expression).

6. miRNA genes potentially regulate EGFR gene expression. In order to determine the impact of the miRNAs on EGFR gene expression in sCRC tumors, 134 candidate miRNAs targeting EGFR expression predicted from the miRDB database were combined to investigate potential correlations between miRNAs and the EGFR gene transcript in metastatic and non-metastatic tumors. Evaluation of each pair of potential miRNA-mRNA targeting EGFR genes identified potential interactions for two inversely correlated (absolute $R^2 \geq 0.71$; $p < 0.0001$) pairs of miRNA-mRNA genes. Based on currently available miRNA target prediction algorithms and databases, such interactions corresponded to only two predictable interactions for the inversely correlated miRNA-mRNA pair (Table 6), miR-134 and miR-4328, in non-metastatic and metastatic tumors, respectively.

Table 5. Correlation between EGFR immunohistochemical (IHC) expression, EGFR gene copy number, determined by FISH techniques and SNP-arrays, and GEP, detected by oligonucleotide arrays, in patients with sporadic colorectal cancer at diagnosis.

	EGFR IHC expression		<i>p</i>
	<35%	≥35%	
FISH			
Normal	27 (75%)	0	<0.001
Amplification	0	8 (57%)	
Polisomy	9 (25%)	6 (43%)	
SNPs			
Normal	21 (68%)	2 (29%)	0.07
Gain	10 (32%)	5 (71%)	
GEP*			
<4	17 (55%)	0	0.009
≥4	14 (45%)	7 (100%)	

FISH: interphase fluorescence in situ hybridization; SNP: single nucleotide polymorphism; GEP: gene expression profile; IHC: immunohistochemistry; Results expressed as number of cases and percentage in parentheses.

*Log2 expression.

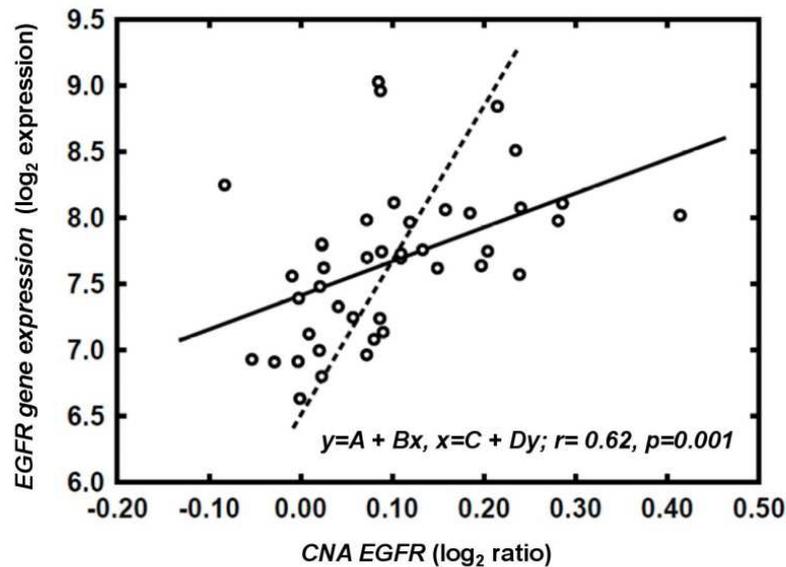
SNPs arrays and GEP studies were performed in 38 cases due to sample restrictions

Table 6: miRNA-mRNA interactions identified in non-metastatic and metastatic colorectal patients by Pearson correlation analysis of the expression signal identified for EGFR transcripts, detected by the Affymetrix Primeview human gene expression array and the microRNA 3.0 expression array.

miRNA	R ²	<i>p</i>	Classification of interaction	Source of validation/prediction
Non-metastatic tumors				
hsa-miR-134_st	-0.72	<0.001	Predicted	miRWalk, miRDB, MiRanda, DIANAmt
hsa-miR-3144-3p	-0.53	0.006	Predicted	miRWalk, miRDB, TargetScan
hsa-miR-4659a-5p	-0.52	0.007	Predicted	miRWalk, miRDB
hsa-miR-133b	-0.51	0.009	Predicted	miRDB
hsa-miR-651_st	-0.47	0.01	Predicted	miRDB, TargetScan
hsa-miR-27a-star_st	-0.46	0.02	Predicted	miRDB, MiRanda, TargetScan
hsa-miR-4476	-0.42	0.03	Predicted	miRDB, miRWalk, TargetScan
hsa-miR-155_st	-0.42	0.03	Predicted	miRDB, TargetScan
hsa-miR-1227_st	-0.42	0.03	Predicted	miRDB, miRWalk, TargetScan
hsa-miR-3126-3p	-0.42	0.03	Predicted	miRDB, TargetScan
Metastatic tumors				
hsa-miR-4328	-0.71	0.001	Predicted	miRDB, TargetScan, MiRanda, DIANAmt
hsa-miR-651_st	-0.64	0.006	Predicted	miRDB, TargetScan, miRWalk
hsa-miR-3616-5p	-0.63	0.006	Predicted	miRDB, TargetScan
hsa-miR-876-3p	-0.62	0.008	Predicted	miRDB, miRWalk
hsa-miR-1233_st	-0.61	0.01	Predicted	miRDB, TargetScan, miRWalk
hsa-miR-548e_st	-0.60	0.01	Predicted	miRDB
hsa-mir-302c_st	-0.59	0.01	Predicted	miRDB
hsa-mir-373_st	-0.55	0.02	Predicted	miRDB, TargetScan, miRWalk
hsa-miR-3686	-0.55	0.02	Predicted	miRDB, TargetScan, miRWalk
hsa-miR-19a-star_st	-0.55	0.02	Predicted	miRDB, TargetScan, miRWalk
hsa-miR-646	-0.54	0.03	Predicted	miRDB, TargetScan, miRWalk
hsa-miR-4504	-0.53	0.03	Predicted	miRDB, TargetScan
hsa-mir-141_st	-0.52	0.03	Predicted	miRDB, TargetScan, miRWalk
hsa-miR-4659a-5p	-0.52	0.03	Predicted	miRDB, TargetScan

R²: Pearson correlation coefficient.

Figure 3. Correlation between EGFR gene expression using oligonucleotide arrays and CNA by SNP arrays in patients with sporadic colorectal cancer at diagnosis. The graphs show the regression lines for Y as a function of X (solid line) and for X as a function of Y (dashed line). If these regression lines are approximately perpendicular, it indicates that X and Y are not linearly correlated. The closer the lines, the greater the correlation.



DISCUSSION

Sporadic colorectal cancer (sCRC) patients who do not show or develop distant metastasis are often cured by surgical resection of the primary tumor, with optional administration of adjuvant therapy. However, the chances of a cure are dramatically reduced when metastasis to the liver or other organs occurs. Even though our understanding of the genetic mechanisms underlying the early stages of familial [21] and sCRC has significantly advanced in recent years [22], the role of IHC in stratifying patient risk is still controversial [23-31]. In this study, we investigated the immunohistochemical profile of primary tumors from metastatic and non-metastatic sCRCs. To avoid false-negative non-metastatic cases, only sCRCs with a relatively long follow-up (median, 103 months) were selected for the non-metastatic tumor group. Similarly, only liver metastatic patients who had undergone complete resection of their primary and metastatic tumors were included in the metastatic patient group.

Antibodies targeting the proteins most frequently involved in sCRC [32, 33] were specifically applied for the immunohistochemical characterization of the two patient groups. Previous observations showing that liver metastatic and non-metastatic sCRCs [34, 24] share a similar pattern of protein expression, as revealed by IHC, were confirmed by our finding of similar immunohistochemical profiles in metastatic and non-metastatic liver tumors for the

expression of most of the antibodies studied (e.g., high levels of c-Myc and p53, Her2 negativity, and Ki-67 expression $\leq 50\%$ in most cases). Conversely, MLH1, PMS2, CEA and EGFR expression were significantly more prevalent in, or even exclusive to, liver metastatic tumors. These findings are evidence of a potential role for these four proteins in the metastasis of sCRC to the liver.

Previous reports of immunohistochemical analyses of metastatic disease from colorectal tumors indicated the presence of microsatellite instability (MSI) caused by the loss of DNA mismatch repair (MMR) activity in 15% of sCRC tumors [35, 36]. In line with other studies, and using similar methods, our results showed the presence of MSI in 16% of the sCRC cases studied. The rate of detection of MSI was also significantly higher in non-metastatic than in liver metastatic cases, as has been suggested by other groups [36-38]. Several studies have shown that the microsatellite profile in sCRC provides useful prognostic information [37], indicating that patients with MSI neoplasms have better OS and a modified response to conventional chemotherapy [39]. However, the better prognosis of MSI carcinomas is highly debatable; many studies demonstrate that they have similar clinical behavior to microsatellite-stable (MSS) carcinomas, and the clinical benefit has only been observed in stage II tumors [40]. There is still no definitive explanation of the prognostic advantage accruing from MSI, although intense lymphocytic infiltration, increased rate of apoptosis, and

infrequent occurrence of allelic loss or mutation of *TP53*, *DCC*, *KRAS* and *BRAF* in MSI colorectal cancer have been proposed as being responsible for their clinical behavior [41-43].

The consensus statement of the College of American Pathologists published in 1999 indicated that pathological TNM stage, extramural venous invasion, and preoperative CEA serum level are the most important category I prognostic factors [44]. It is well established that the preoperative CEA serum level is an important prognostic factor [44, 45], whereby levels greater than 5 ng/ml are related to worse prognosis. In fact, in a recent study, we reported the existence of highly prevalent, abnormally high CEA serum levels (≥ 7.5 ng/ml) in the great majority of primary sCRC patients with synchronous liver metastasis [6]. Consistent with the findings of previous studies using IHC techniques [31], we observed a significantly higher level of CEA expression in patients with metastatic tumors than in those with non-metastatic tumors. CEA is involved in cell adhesion, protecting cells from anoikis (apoptosis induced by the loss of anchoring of the cell to the extracellular matrix) [46], which favors the cell's metastatic potential. In addition, CEA can bind to Kupffer cells [47], modulate the inflammatory response in the liver, and protect tumor cells from oxygen radicals [48]. *In vitro* studies have shown resistance of cells expressing CEA to lysis induced by activated killer cells (LAK cells) [49]. These biological functions of CEA may explain why tumors with stronger expression have greater metastatic potential.

In addition to CEA expression associated with the metastatic process, we also found EGFR expression to be an independent prognostic factor of disease outcome, as previously observed [50,51]. Previous studies employing IHC analysis [50,51] have shown an association between EGFR expression and liver metastasis in sCRC patients; here, we also found that EGFR-positive tumors had lymph node metastases and a higher TNM category at diagnosis. Similarly, Goos *et al.* [52] reported that, in a series of 323 patients with metastatic CRC, those who strongly expressed EGFR had a worse prognosis. Other studies have found a correlation between EGFR expression and more advanced disease [51,53,54], metastatic spread [31,55,56] and worse prognosis [57]. In addition, Du P *et al.* [56] have suggested that EGFR plays an important role in the angiogenesis of early tumors. EGFR is associated with the progression of colorectal carcinoma, and is a widely used prognostic factor. However, other authors have reported controversial results from their IHC assessment of EGFR expression and its correlation with sCRC prognosis. Tsai *et al.* [58] found no differences in EGFR expression between tumors of various grades and stages, or in survival, despite analyzing a large series of patients (n=150). This could be because EGFR-positive cases were classified into three categories (1+, 2+ and 3+), rather than being measured as the

percentage of positive tumor cells, as we have done in the present study.

We found significant correlations for EGFR staining results, oligonucleotide expression arrays, FISH analysis and SNP arrays. This is the first study in which the immunohistochemical expression of EGFR has been validated by three molecular techniques in metastatic and non-metastatic tumors. In accordance with other studies, EGFR overexpression was frequently accompanied by gene amplification and/or a high frequency of chromosome 7 polysomies, especially in metastatic colorectal tumors, as found by other researchers [55,59-61]. Furthermore, a review of the data showed that patients with sCRC diagnosed as EGFR-positive by FISH also responded to treatment with cetuximab monotherapy [60,61]. In fact, the dosage of cetuximab that inhibited proliferation in mCRC cell populations with amplified numbers of *EGFR* copies had no effect on cell populations that did not feature EGFR amplification. Moroni M *et al.* found that eight of nine patients with objective responses who could be assessed by FISH had a higher EGFR copy number, suggesting that case-selection for anti-EGFR therapy may be based on the number of *EGFR* gene copies [60]. Our findings show that gene amplification, transcriptional upregulation, abnormal receptor structure secondary to genetic alterations (e.g., mutation and polymorphism) or specific miRNA levels could be responsible for EGFR overexpression, and therefore predictors of disease prognosis [62,63].

Here, we also identified miR-134 and miR-4328 as negatively regulated EGFR targets in non-metastatic and metastatic tumors, respectively. Previous studies have confirmed that both miRNAs have important roles in the progression of sCRC. These studies on the EGFR-miRNA regulation network highlight the possibility that, in addition to tyrosine kinase inhibitors and classical monoclonal antibodies for EGFR-targeted therapies, miRNA-based therapy could be used to target EGFR. miRNA-134 has important roles in cancer, such as regulating cell proliferation [64,65], migration [64], invasion [64] and the epithelial-mesenchymal transition [66,67]. Qin *et al.* [68], using intratumoural injection of miR-134, observed a reduction in the expression of EGFR in non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) cell lines, suggesting that the use of miR-134 could be a potential strategy for EGFR-targeted therapy. Sherien *et al.* [69] showed that miRNA-134 is a potential tumor suppressor miRNA and could be fundamental to the suppression of colorectal cancer tumorigenesis through its ability to coordinately regulate the EGFR signaling cascade by independently targeting EGFR and PIK3CA. In metastatic tumors, EGFR overexpression was more frequently detected as a consequence of gene amplification or a high frequency of polysomies. Interestingly, interactions of the inversely correlated miRNA-mRNA pairs in the

metastatic patient series revealed the miRNA-4328 to be a possible regulator of *EGFR* expression. Information is available about miRNA-4328 in CRC patients; it has been previously described as an *EGFR* regulator in *EGFR*-mutated lung adenocarcinomas [70]. However, additional GEP and functional studies, as well as direct comparison of non-metastatic and metastatic tumors are needed to confirm our observations and to provide deeper insight into the role of miRNA-4328 in metastatic CRC patients.

In summary, in the present study, we show that *EGFR* protein expression and copy number are closely related. *EGFR* expression is an independent adverse prognostic factor of OS in sCRC patients. The expression of the *EGFR* gene could be regulated by amplification mechanisms or a high frequency of polysomies, as is often observed in metastatic tumors, or by miRNAs (i.e., miRNA-134) in non-metastatic tumors. We also showed that the possible involvement of *EGFR* expression in sCRC patients with liver metastasis is intrinsically related to greater metastatic potential and poor outcome, providing additional prognostic information about the pTNM stage. Further prospective studies are required in larger series to confirm the utility of the proposed predictive model.

REFERENCES

- Colorectal cancer Source: Globocan 2018 Number of new cases in 2018, both sexes, all ages. **2018**. <http://gco.iarc.fr/today>
- Parkin, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* **2001**, 2, 533–43.
- Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol.* **2007**, 25, 3238–45.
- Golubnitschaja O, Sridhar KC. Liver metastatic disease: new concepts and biomarker panels to improve individual outcomes. *Clin Exp Metastasis.* **2016**, 33, 743–55.
- Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* **2005**, 23, 3526–35.
- González-González M, Muñoz-Bellvis L, Mackintosh C, Fontanillo C, Gutiérrez ML, Abad MM, et al. Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as Assessed by Interphase FISH in Sporadic Colorectal Carcinomas. *PLoS One*, **2012**, 7, e42683.
- Ma YS, Huang T, Zhong XM, Zhang HW, Cong XL, Xu H, Lu GX, Yu F, Xue SB, Lv ZW, Fu D. Proteogenomic characterization and comprehensive integrative genomic analysis of human colorectal cancer liver metastasis. *Mol Cancer.* **2018**, 17, 139.
- Sayagués JM, Fontanillo C, Abad MDM, González-González M, Sarasquete ME, Chillon MDC, et al. Mapping of genetic abnormalities of primary tumours from metastatic CRC by high-resolution SNP arrays. *PLoS One.* **2010**, 6, e13752.
- Gutiérrez ML, Corchete LA, Sarasquete ME, Del Mar Abad M, Bengoechea O, Fermiñán E, et al. Prognostic impact of a novel gene expression profile classifier for the discrimination between metastatic and non-metastatic primary colorectal cancer tumors. *Oncotarget.* **2017**, 8, 107685–700.
- Bouchie A. Coming soon: a global grid for cancer research. *Nat Biotechnol.* **2004**, 22, 1071–3.
- Motameny S, Wolters S, Nürnberg P, Schumacher B. Next Generation Sequencing of miRNAs - Strategies, Resources and Methods. *Genes (Basel).* **2010**, 1, 70–84.
- Egner JR. AJCC Cancer Staging Manual. *JAMA* **2010**, 304, 1726.
- Sousa WAT de, Rodrigues LV, Silva RG da, Vieira FL. Immunohistochemical evaluation of p53 and Ki-67 proteins in colorectal adenomas. *Arq Gastroenterol.* **2012**, 49, 35–40.
- González-González M, Fontanillo C, Abad MM, Gutiérrez ML, Mota I, Bengoechea O, et al. Identification of a characteristic copy number alteration profile by high-resolution single nucleotide polymorphism arrays associated with metastatic sporadic colorectal cancer. *Cancer.* **2014** 120, 1948–59.
- Muñoz-Bellvis L, Fontanillo C, González-González M, Garcia E, Iglesias M, Esteban C, et al. Unique genetic profile of sporadic colorectal cancer liver metastasis versus primary tumors as defined by high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Mod Pathol.* **2012**, 25, 590–601.
- Sayagués JM, Corchete LA, Gutiérrez ML, Sarasquete ME, Del Mar Abad M, Bengoechea O, et al. Genomic characterization of liver metastases from colorectal cancer patients. *Oncotarget.* **2016**, 7, 72908–22.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **2003**, 34, 374–8.

18. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**, 98, 5116–21.
19. 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, 839–47.
20. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. **2009**, 37, D105-10.
21. Syngal S, Fox EA, Li C, Dovidio M, Eng C, Kolodner RD, et al. Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *JAMA*. **1999**, 282, 247–53.
22. Maltzman T, Knoll K, Martinez ME, Byers T, Stevens BR, Marshall JR, et al. Ki-ras proto-oncogene mutations in sporadic colorectal adenomas: relationship to histologic and clinical characteristics. *Gastroenterology* **2001**, 121, 302–9.
23. Vrabie CD, Ceașu M, Petrescu A, Waller M, Dina I. The usefulness of immunohistochemistry in sporadic colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* **2008**, 49, 525–35.
24. Jansson A, Sun XF. Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *APMIS*, **1997**, 105, 730–4.
25. Ahmed NY, Ismail AT, Kareem TS. A clinicopathologic study of Ki-67 proliferation index in colorectal carcinoma. *Saudi Med J*. **2012**, 33, 841–5.
26. Valera V, Yokoyama N, Walter B, Okamoto H, Suda T, Hatakeyama K. Clinical significance of Ki-67 proliferation index in disease progression and prognosis of patients with resected colorectal carcinoma. *Br J Surg*. **2005**, 92, 1002–7.
27. Liu B-W, Liu Y, Liu J-R, Feng Z-X, Liu T. Prognostic effect of p53 expression in patients with completely resected colorectal cancer. *Tumor Biol*. **2014**, 35, 9893–6.
28. Nasif WA, Lotfy M, El-Sayed IH, El-Kenawy AE-M, El-Shahat M, El-Hak NG. Implications of CEA and p53 overexpression in the poor prognosis of colorectal cancer. *Med Oncol*. **2006**, 23, 237–44.
29. Pyo JS, Kang G, Park K. Clinicopathological Significance and Diagnostic Accuracy of HER2 Immunohistochemistry in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Int J Biol Markers*. **2016**, 31, 389–94.
30. Toon CW, Chou A, Clarkson A, DeSilva K, Houang M, Chan JCY, et al. Immunohistochemistry for Myc Predicts Survival in Colorectal Cancer. *PLoS One* **2014**, 9, e87456.
31. Qian L-Y, Li P, Li X-R, Chen D-J, Zhu S-H. Multivariate analysis of molecular indicators for postoperative liver metastasis in colorectal cancer cases. *Asian Pac J Cancer Prev* **2012**, 13, 3967–71.
32. Li N, Wang J, Shen S, Bu X, Tian X, Huang P. Expression of p53, Ki-67 and c-Myc proteins is predictive of the surgical molecular margin in colorectal carcinoma. *Pathol Oncol Res*. **2011**, 17, 479–87.
33. Lee KS, Kwak Y, Nam KH, Kim D-W, Kang S-B, Choe G, et al. Favorable prognosis in colorectal cancer patients with co-expression of c-MYC and β -catenin. *BMC Cancer*. **2016**, 16, 730.
34. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 Patients With Right- and Left-Sided Colon Cancer: Differences in Epidemiology, Perioperative Course, Histology, and Survival. *Dis Colon Rectum*. **2010**, 53, 57–64.
35. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. **2010**, 138, 2073–2087.
36. Kloor M, Staffa L, Ahadova A, von Knebel Doeberitz M. Clinical significance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Langenbeck's Arch Surg*. **2014**, 99, 23–31.
37. Alvarado-Bachmann R, Smith A, Gundara JS, Kuo SC, Gill AJ, Samra JS, Hugh TJ. The incidence of mismatch repair gene defects in colorectal liver metastases. *Mol Med Rep*. **2014**, 10, 1003–6.
38. Kim CG, Ahn JB, Jung M, Beom SH, Kim C, Kim JH, et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *Br J Cancer* **2016**, 115, 25–33.
39. Setaffy L, Langner C. Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance. *Pol J Pathol*. **2015**, 66, 203–18.
40. Saridaki Z, Souglakos J, Georgoulas V. Prognostic and predictive significance of MSI in stages II/III colon cancer. *World J Gastroenterol*. **2014**, 20, 6809.
41. Guidoboni M, Gafà R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, et al. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic

- lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol.* **2001**, 159, 297–304.
42. Michael-Robinson JM, Biemer-Hüttmann A, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, et al. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut* **2001**, 48, 360–6.
43. Michael-Robinson JM, Reid LE, Purdie DM, Biemer-Hüttmann AE, Walsh MD, Pandeya N, et al. Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* **2001**, 7, 2347–56.
44. Compton CC, Compton CC, Fielding LP, Fielding LP, Burgart LJ, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* **2000**, 124, 979–94.
45. Wang JY, Lu CY, Chu KS, Ma CJ, Wu DC, Tsai HL, et al. Prognostic significance of pre- and postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancer. *Eur Surg Res.* **2007**, 39, 245–50.
46. Ordoñez C, Sreaton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res.* **2000**, 60, 3419–24.
47. Bajenova O V, Zimmer R, Stolper E, Salisbury-Rowswell J, Nanji A, Thomas P. Heterogeneous RNA-binding protein M4 is a receptor for carcinoembryonic antigen in Kupffer cells. *J Biol Chem.* **2001**, 276, 31067–73.
48. Thomas P, Forse RA, Bajenova O. Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin Exp Metastasis.* **2011**, 28, 923–32.
49. Kammerer R, von Kleist S. CEA expression of colorectal adenocarcinomas is correlated with their resistance against LAK-cell lysis. *Int J cancer.* **1994**, 57, 341–7.
50. Rego RL, Foster NR, Smyrk TC, Le M, O'Connell MJ, Sargent DJ, et al. Prognostic effect of activated EGFR expression in human colon carcinomas: comparison with EGFR status. *Br J Cancer.* **2010**, 102, 165–72.
51. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol.* **2005**, 16, 102–8.
52. Goos JACM, Hiemstra AC, Coupé VMH, Diosdado B, Kooijman W, Delis-Van Diemen PM, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) are prognostic biomarkers for patients with resected colorectal cancer liver metastases. *Br J Cancer.* **2014**, 111, 749–55.
53. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer.* **2001**, 92, 1331–46.
54. Karameris A, Kanavaros P, Aninos D, Gorgoulis V, Mikou G, Rokas T, et al. Expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63 cases. *Pathol Res Pract.* **1993**, 189, 133–7.
55. Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg D, Bucana CD, et al. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* **1995**, 1, 19–31.
56. Du P, Xu B, Zhang D, Shao Y, Zheng X, Li X, et al. Hierarchical investigating the predictive value of p53, COX2, EGFR, nm23 in the post-operative patients with colorectal carcinoma. *Oncotarget.* **2017**, 8, 954–66.
57. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, De Vita F, Castellano P, Orditura M, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann Surg Oncol.* **2006**, 13, 823–35.
58. Tsai W-C, Lin C-K, Lee H-S, Chen A, Nieh S, Yu C-P, et al. Discordance between EGFR expression and clinicopathologic parameters of colorectal adenocarcinoma in Taiwan. *Chin J Physiol.* **2012**, 55, 352–60.
59. Hemmings C, Broomfield A, Bean E, Whitehead M, Yip D. Immunohistochemical expression of EGFR in colorectal carcinoma correlates with high but not low level gene amplification, as demonstrated by CISH. *Pathology.* **2009**, 41, 356–60.
60. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* **2005**, 6, 279–86.
61. Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, Jänne PA, Carnaghi C, Calandri C, et al. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in

- chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* **2008**, 19, 717–23.
62. Shen W-D, Chen H-L, Liu P-F. EGFR gene copy number as a predictive biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer treatment: a meta-analysis. *Chin J Cancer Res.* **2014**, 26,;59–71.
63. Khan SA, Zeng Z, Shia J, Paty PB. EGFR Gene Amplification and KRAS Mutation Predict Response to Combination Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Pathol Oncol Res.* **2017**, 23, 673–7.
64. Niu CS, Yang Y, Cheng C-D. MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression. *Int J Oncol.* **2013**, 42:1533–40.
65. Zhang X, Wang H, Zhang S, Song J, Zhang Y, Wei X, et al. MiR-134 functions as a regulator of cell proliferation, apoptosis, and migration involving lung septation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **2012**, 48, 131–6.
66. Li J, Wang Y, Luo J, Fu Z, Ying J, Yu Y, et al. miR-134 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting FOXM1 in non-small cell lung cancer cells. *FEBS Lett.* **2012**, 586, 3761–5.
67. Liu Y, Zhang M, Qian J, Bao M, Meng X, Zhang S, et al. miR-134 functions as a tumor suppressor in cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal Transition by targeting KRAS in renal cell carcinoma cells. *DNA Cell Biol.* **2015**, 34, 429–36.
68. Qin Q, Wei F, Zhang J, Wang X, Li B. miR-134 inhibits non-small cell lung cancer growth by targeting the epidermal growth factor receptor. *J Cell Mol Med* **2016**, 20, 1974–83.
69. El-Daly SM, Abba ML, Patil N, Allgayer H. miRs-134 and -370 function as tumor suppressors in colorectal cancer by independently suppressing EGFR and PI3K signalling. *Sci Rep.* **2016** 6:24720.
70. Bjaanaes MM, Halvorsen AR, Solberg S, Jørgensen L, Dragani TA, Galvan A, et al. Unique microRNA-profiles in EGFR-mutated lung adenocarcinomas. *Int J cancer.* **2014** 135, 1812–21.

Supplementary table 1. Commercial antibodies used in the study.

Antibody	Clone	Dilution	Manufacturer	Interpretation
CK7	RN7	1:100	Novocastra	Cytoplasmic stain
CK20	K ₁₂ 20.8	Prediluted	Novocastra	Cytoplasmic stain
CDX2	CDX2-88	Prediluted	Biocare	Nuclear stain
MLH1	G168-15	1:25	BD Pharmingen	Negative: no tumor nuclei stained with internal positive control
MSH2	FE11	Prediluted	Biocare	Positive: at least one tumor nucleus stained with positive internal control
MSH6	BC/44	Prediluted	Biocare	
PMS2	M0R4G	1:50	Novocastra	
c-Myc	Y69	Prediluted	Master Diagnostica	Negative: <10% positive nuclei Positive: ≥10% positive nuclei
Her2	Bond Oracle HER2 IHC System		Leica	0+: No reactivity or no membranous reactivity in any tumor cell 1+: Tumor cell cluster with a faint/barely perceptible membranous reactivity irrespective of percentage of tumor cells stained 2+: Tumor cell cluster with a weak to moderate complete, basolateral, or lateral membranous reactivity, irrespective of percentage of tumor cells stained 3+: Tumor cell cluster with a strong complete, basolateral, or lateral membranous reactivity, irrespective of percentage of tumor cells stained
p53	DO-7	1:100	Novocastra	0: no nuclei stained 1: 0-10% positive nuclei 2: ≥10% positive nuclei
β-catenin	Polyclonal	Prediluted	Master Diagnostica	Negative: <30% positive nuclei Positive: ≥30% positive nuclei
CEA	12-140-1	1:100	Novocastra	Negative: no stained cells or non-specific stain Positive: any specific cytoplasmic stain
EGFR	2-18C9	Prediluted	DAKO	0: no membranous stain in any tumor cell 1-10%: percentage of tumor cells with membranous stain 10-35%: percentage of tumor cells with membranous stain >35%: percentage of tumor cells with membranous stain
Ki-67	SP6	1:100	Master Diagnostica	Negative: <50% positive nuclei Positive: ≥50% positive nuclei

V. DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado de forma notable el número de estudios encaminados al análisis de las características genéticas del cáncer colorrectal (CCR), lo cual ha proporcionado importantes avances en la identificación de las alteraciones genéticas más frecuentes en estos tumores^{57,130,294,295}, especialmente aquellas asociadas al tratamiento de la enfermedad. Así mismo, a semejanza de lo que ocurre en otros tumores, se ha sugerido que algunas de las alteraciones genéticas/cromosómicas podrían estar asociadas a la evolución y al comportamiento clínico del CCR^{296,151,263,297,298,299}). Sin embargo, sigue existiendo una gran variabilidad entre los diferentes trabajos publicados, con resultados a veces incluso contradictorios, en relación con la incidencia de las alteraciones genéticas más frecuentes en el CCR. A modo de ejemplo, las mutaciones a nivel de los genes *KRAS* y *BRAF* varían en la bibliografía entre el 15³⁰⁰ y el 52%³⁰¹, y entre el 4³⁰² y 22%³⁰³ de los casos analizados, respectivamente. Esta variabilidad puede ser debida, al menos en parte, a que en algunos de estos trabajos no se toma en consideración la naturaleza heterogénea de estos tumores, caracterizados por la existencia de perfiles genéticos (frecuentemente) complejos, de patrones infiltrativos en los que se entremezclan en diferentes proporciones células de la mucosa normal y células del estroma con las células tumorales dificultando la identificación y caracterización de poblaciones celulares poco representadas en la muestra tumoral, además de la gran diversidad de técnicas empleadas para el estudio genético de estos tumores habitualmente enfocadas a descifrar las alteraciones globales del mismo. Por este motivo, aun cuando se hayan definido las alteraciones moleculares más frecuentes en el CCR, la información disponible actualmente acerca de las vías de evolución clonal presentes a nivel intratumoral en estos tumores, incluyendo aquellas que involucran las alteraciones genéticas más habituales, sigue siendo muy limitada, principalmente debido a que en la

mayoría de laboratorios el análisis genético se suele realizar en el tumor primario, sin tener en cuenta los ganglios o bien las diferentes muestras metastásicas. Por otra parte, la gran mayoría de los estudios disponibles hasta la fecha han centrado su objetivo principal en el análisis de los genes que directamente están implicados en la respuesta a tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-EGFR (*KRAS* y *NRAS*), siendo mucho más limitada la información disponible acerca del estado mutacional de otros genes involucrados también en la vía de señalización EGFR, tales como *BRAF* y *TP53*, o bien el estado de la expresión de la propia proteína.

En esta tesis doctoral hemos centrado nuestro objetivo en profundizar en la caracterización genética y genómica del CCR esporádico enfocado, por un lado, al estudio de las mutaciones de los genes más frecuentemente alterados en estos tumores y los patrones de evolución clonal existentes a nivel intratumoral, analizando tumor primario, ganglios y metástasis de cada uno de los pacientes estudiados y, por otra parte, al estudio de los perfiles de expresión que afectan a proteínas implicadas en la transformación neoplásica de la mucosa normal, para finalmente determinar el posible impacto de las alteraciones encontradas en el comportamiento histopatológico y la evolución clínica de los pacientes.

SECUENCIACIÓN MASIVA PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN CCR ESPORÁDICO, CORRELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLINICO-BIOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD E IMPACTO PRONÓSTICO

En la actualidad existe un consenso general sobre la necesidad de evaluar simultáneamente múltiples marcadores moleculares con el fin de clasificar de manera precisa a los pacientes con CCR esporádico y poder proporcionarles un tratamiento personalizado. En este sentido, las metodologías de alto rendimiento, en especial las técnicas de secuenciación masiva, están cambiando el escenario actual de la clasificación de la mayor parte de las enfermedades y adquiere especial relevancia en el CCR esporádico, en el que no solo es importante el diagnóstico, sino también el pronóstico y el tratamiento del paciente. El desarrollo de estas tecnologías permite abordar el análisis mutacional de un mayor número de genes a unos costes más reducidos. En el presente trabajo, diseñamos un panel de amplicones para la identificación simultánea de mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *TP53* para investigar la frecuencia de mutaciones en una serie de 87 pacientes diagnosticados en nuestro centro de CCR esporádico, para determinar el impacto potencial de las mutaciones detectadas en pronóstico del paciente y su asociación con las características clínicas y patológicas de la enfermedad. El panel diseñado amplificó con éxito los 53 amplicones, con una profundidad media de lecturas de 2400x en todas las muestras analizadas y de una muestra de ADN control. La frecuencia y tipo de las diferentes mutaciones identificadas fue concordante con los datos previamente descritos en la literatura^{304,305,306}. Además, observamos que de los 4 genes analizados; únicamente la mutación *BRAF* V600E sola o asociada al estadio TNM en el momento del diagnóstico tuvo un impacto pronóstico independiente tanto para la SG del paciente como para la SLE. No obstante, otras características de la enfermedad, histopatológicas (grado histológico del tumor, presencia de invasión perineural y linfovascular), clínicas (edad) o genéticas (el estado de los

microsatélites) también demostraron tener un valor pronóstico cuando se consideraron de forma individual, en el análisis multivariante perdieron la significación estadística.

La frecuencia y la importancia clínica de las mutaciones a nivel del gen *KRAS* se han investigado a fondo en pacientes con CCR, particularmente en el contexto del uso de terapias con anti-EGFR^{304,307,139}. A pesar de ello, el impacto pronóstico de las mutaciones de *KRAS* en pacientes con CCR sigue siendo controvertido. Aunque algunos estudios han encontrado que las mutaciones del exón 2 (codón 13) predicen un pronóstico adverso, mayor riesgo de recidiva y tasas de supervivencia más cortas³⁰⁸, otros estudios destacan el valor pronóstico de las mutaciones de *KRAS* en los exones 3 y 4 (codones 61, 146 y 147), como marcador predictivo de SLE^{101,309} y SG^{309,253}. Por otro lado, otros autores como Palomba *et al*, no encontraron un impacto pronóstico significativo para las mutaciones de *KRAS* en una gran serie de 1.284 pacientes con CCR³¹⁰. Estos resultados aparentemente controvertidos sobre la posible importancia pronóstica de las mutaciones de *KRAS* en CCR, probablemente sean debidos principalmente a la gran heterogeneidad genética presente en este tipo tumores, y a las diferencias en la serie de pacientes analizados³¹¹. En este sentido, varios estudios han mostrado discrepancias en el estado mutacional de *KRAS* entre las diferentes muestras tumorales del mismo paciente, y también se han observado discrepancias entre las distintas técnicas de biología molecular utilizadas para la detección de estas mutaciones. Por ejemplo, Li *et al*. encontraron una tasa de discordancia del 19% en la frecuencia de mutaciones de *KRAS* estudiadas mediante técnicas de PCR en tiempo real vs. genotipado de SNPs (MassARRAY[®]), entre tumores primarios y lesiones metastásicas pareadas en pacientes chinos con CCR²²⁹. En nuestro estudio, encontramos mutaciones en *KRAS* en un tercio de los pacientes analizados, particularmente en tumores bien diferenciados, localizados en el colon derecho y sin invasión linfovascular, todo ello concordante con observaciones previas^{297,312,313,314}. Sin embargo, en nuestra serie, los pacientes con *KRAS* mutado no mostraron diferencias significativas en la SLE y SG con aquellos pacientes que no mostraron mutaciones en este gen.

De forma similar, aunque algunos estudios previos han descrito una asociación entre las mutaciones a nivel del gen *NRAS* y una menor SG³¹⁵, no pudimos confirmar estos hallazgos en nuestra serie, ya que, en línea con estudios previos³¹⁶, solo 1 de los 87 pacientes estudiados mostró una mutación en *NRAS*. Por lo tanto, consideramos que se

requieren más estudios en series más grandes de pacientes CCR para establecer el impacto pronóstico de las mutaciones en este gen.

Como era de esperar, la frecuencia global de mutaciones *BRAF* detectadas en nuestra serie fue menor que la de *KRAS*^{101,310}. Cabe destacar que los pacientes portadores de mutaciones *BRAF* con mayor frecuencia mostraban características pronósticas adversas, mayor frecuencia de tumores pobremente diferenciados³¹⁷, presencia de carcinomatosis peritoneal^{314,318} e inestabilidad de microsatélites, como ha sido anteriormente descrito en la literatura^{297,319}. Además, y de acuerdo con estudios previos, la mitad de los pacientes de nuestra serie con mutación *BRAF* se encontraron en estadio III de la enfermedad³²⁰. La mutación de *BRAF* mostró tener un impacto pronóstico adverso independiente de cualquier otra característica de la enfermedad, tanto para la SLE como para la SG, hecho que también ha sido descrito por otros autores^{321,101,322,323}. No obstante, para confirmar estas observaciones se requieren estudios prospectivos adicionales en series más grandes de pacientes.

Las mutaciones en el gen *TP53* se detectaron en un tercio de nuestros casos, una frecuencia que se encuentra en el rango inferior al descrito anteriormente por otros autores^{324,325}. De acuerdo con observaciones previas, las mutaciones en *TP53* se observaron con mayor incidencia en mujeres³²⁶, pero no mostraron ningún impacto en la supervivencia del paciente. En este sentido, los estudios publicados sobre la asociación potencial entre las mutaciones de *TP53* y el pronóstico del CCR han arrojado resultados contradictorios^{327,328}. Esto podría deberse a una potencia estadística insuficiente (tanto en nuestra como en otras series) para detectar diferencias modestas de supervivencia entre pacientes con *TP53* mutado y no mutado, la necesidad de un seguimiento más prolongado y la influencia potencial de la terapia adyuvante. Además, debe tenerse en cuenta que el alelo no mutado del gen *TP53* podría ser funcional y contrarrestar el fenotipo mutado; por lo tanto, serían necesarios más estudios para investigar el impacto pronóstico de las alteraciones genéticas de *TP53* que afectan al otro gen *TP53*, (p. Ej. la delección de 17p)²⁹⁶.

Además de las alteraciones genéticas, otras características clínicas-biológicas de la enfermedad mostraron también una influencia significativa a la hora de predecir el pronóstico de los pacientes con CCR. Entre ellas cabe destacar, el sexo femenino, el estadio avanzado de la enfermedad en el momento del diagnóstico, los tumores mal diferenciados y la presencia de invasión linfovascular / perineural en la pieza quirúrgica,

que junto con el estado mutacional *BRAF*, se asociaron con un impacto adverso en la SLE (en el análisis univariante), resultados que están en línea con estudios previos^{296,330,331,332}. Por el contrario, en el análisis univariante solo tuvieron impacto pronóstico en la SG el estadio TNM en el momento del diagnóstico, el tamaño del tumor, la inestabilidad de microsatélites y el estado mutacional de *BRAF*. No obstante, el análisis multivariante de los distintos factores pronósticos mostró que la presencia de mutaciones en *BRAF* y un estadio TNM avanzado en el momento del diagnóstico constituyen la mejor combinación de variables independientes para predecir SLE en pacientes con CCRe. En base a estas variables, construimos un sistema de puntuación original que permitió estratificar a los pacientes en tres grupos de riesgo con tasas de SLE significativamente diferentes a los 2 años. Además, este sistema de puntuación fue validado en una serie independiente (n=533 pacientes) que refuerza aún más esta evidencia. Cabe destacar, que en este modelo el estado mutacional de *BRAF* contribuyó específicamente a la sub-estratificación de pacientes con TNM en estadio III en casos intermedios frente a casos de alto riesgo de recaída. A pesar de que se ha descrito la asociación entre el estado mutacional de los genes involucrados en la vía de señalización de EGFR y el pronóstico de pacientes con CCR^{322,333,334,335,336}, hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se propone un sistema de puntuación basado en la evaluación combinada del estadio TNM en el momento del diagnóstico y el estado mutacional *BRAF*, para la identificación de pacientes con CCR sometidos a resección tumoral completa con un alto riesgo de recurrencia en los primeros 2 años tras diagnóstico (puntuación 2) de la enfermedad. Si el valor pronóstico de este nuevo modelo de estratificación de riesgo se confirma en series prospectivas de pacientes con CCR esporádico, podría contribuir a allanar el camino para los ensayos que evalúan las terapias dirigidas a *BRAF* en este subgrupo específico de casos de CCR esporádico.

PATRONES DE EVOLUCIÓN CLONAL PRESENTES A NIVEL INTRATUMORAL EN EL CCR. PERFIL MUTACIONAL EN MUESTRAS PAREADAS DE TUMOR PRIMARIO, METÁSTASIS GANGLIONARES Y HEPÁTICAS EN PACIENTES CON CCR.

El CCR esporádico es un grave problema sanitario debido a su elevada incidencia y mortalidad². La cirugía es la más eficaz de las estrategias terapéuticas en este tipo de tumor, pero en los últimos años se están investigando nuevos fármacos contra componentes diana específicos de las células tumorales, que mejoran la supervivencia en pacientes con enfermedad avanzada y recurrencias. En este sentido, el empleo del nuevo arsenal terapéutico basado en el uso de anticuerpos monoclonales frente al gen EGFR, el conocimiento del estado mutacional de los genes *KRAS* y *NRAS* es imprescindible debido a su valor predictivo negativo de respuesta al uso de dichos tratamientos. Este hecho ha potenciado la necesidad de la implementación de dichas determinaciones en la mayoría de los hospitales de una manera estandarizada dentro de la práctica asistencial diaria. No obstante, a pesar de estos conocimientos aproximadamente el 50% de los pacientes con CCR metastásico no presentan mutaciones en *KRAS* y presentan resistencia al tratamiento con inhibidores de EGFR^{337,338}. Por lo tanto, la presencia de un genotipo *KRAS* nativo en los tumores primarios de pacientes con CCR metastásico no garantiza el beneficio de los inhibidores de EGFR³³⁸. La identificación de otros factores que puedan predecir la resistencia al tratamiento es de gran importancia para identificar qué pacientes con CCR metastásico y *KRAS* nativo no serán respondedores y desarrollarán resistencia. De hecho, estudios recientes indican que el CCR es un tumor genéticamente heterogéneo, que con frecuencia muestra cariotipos complejos (> 3 alteraciones genética), en el que coexisten dos o más clones de células tumorales portadores de diferentes alteraciones genéticas. De acuerdo con ello, en este trabajo, basado en la utilización de técnicas de PCR específico de alelo para la detección de múltiples regiones frecuentemente alteradas en el CCR, observamos patrones genéticos complejos en la mayoría de las muestras tumorales de los

CCR estudiados. Para ello analizamos 76 muestras correspondientes a 26 pacientes con CCR metastásico no tratados, con el fin de establecer las vías de evolución clonal a nivel intratumoral. Las muestras correspondieron a 26 tumores primarios, 16 ganglios linfáticos metastásicos y 34 metástasis hepáticas. En nuestro conocimiento, este constituye el primer estudio que establece un modelo hipotético de evolución clonal intratumoral de los genes alterados con mayor frecuencia en CCR esporádico (*KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* y *BRAF*), analizando de forma pareada el estado mutacional en los tumores primarios, así como en las metástasis ganglionares y hepáticas, usando arrays de baja densidad. Con esta aproximación hemos podido caracterizar de forma específica al diagnóstico, los distintos clones de células neoplásicas que coexistían en una misma muestra tumoral, incluyendo aquellos clones presentes en frecuencias relativamente bajas (<1% de la celularidad del tumor). En general, nuestros resultados muestran que los tumores colorrectales son neoplasias genéticamente muy heterogéneas tanto a nivel intratumoral como intertumoral, lo que probablemente repercuta en la respuesta a los agentes dirigidos frente a la vía de señalización EGFR. Un análisis más detallado de los clones de células tumorales detectados en cada muestra permitió, por otra parte, establecer una relación ontogénica entre ellos y por otro lado, definir para cada tumor un modelo hipotético de evolución clonal. Para poder identificar la secuencia de las mutaciones acumuladas en un tumor con múltiples clones, asumimos que aquellas mutaciones compartidas por todos los subclones representarían cambios relativamente tempranos; por el contrario, las mutaciones tardías serían aquellas que sólo estaban presentes en algunos de los subclones tumorales.

La heterogeneidad genética del tumor primario es un reto bien conocido en la aplicación de la medicina personalizada^{339,340,341}. En estudios previos se ha visto la heterogeneidad de las mutaciones de *KRAS* en CCR metastásicos primarios^{226,342} y también con respecto a la concordancia del estado mutacional entre los tumores primarios y las muestras metastásicas^{343,344}. Sin embargo, la heterogeneidad mutacional entre metástasis en órganos y metástasis ganglionares no está bien descrita. Tomando como ejemplo las mutaciones de *KRAS*, algunos estudios han mostrado un 100% de concordancia entre tumores primarios de CCR y sus correspondientes muestras metastásicas^{345,346}, mientras que otros autores muestran discordancias que oscilan entre el 4 y el 30%^{347,230}. En este sentido, Losi *et al.*³⁴⁸ estudiaron tumores primarios y metástasis pareadas de 35 pacientes, e informaron mutaciones de *KRAS* presentes en el 71% de los casos con una concordancia del 100%, incluso en recidivas locales del mismo paciente. Sin embargo, la literatura en

series consecutivas muestra una incidencia de mutaciones a nivel de *KRAS* entre el 30-45% de los pacientes con CCR metastásico^{250,252,349}. La serie analizada por Knijn et al. (n = 305 pacientes) mostró una concordancia del 96% en el estado de *KRAS* entre el tumor primario y metástasis hepáticas pareadas³⁵⁰. Este hallazgo es acorde al hecho de que las mutaciones de *KRAS* se presentan principalmente como un evento molecular temprano. Por otro lado, existe una evidencia creciente de un grado de discordancia en el estado mutacional de *KRAS* entre diferentes muestras tumorales del mismo paciente. Recientemente, Jeantet et al.³⁵¹ describieron un 33% de los casos con heterogeneidad intratumoral espacial para mutaciones en RAS, donde observaron que dentro del mismo tumor coexistían zonas con mutaciones en *KRAS* y/o en *NRAS* y zonas del tumor sin la presencia de estas mutaciones. Kosmidou et al.²²⁷ encontraron una heterogeneidad intratumoral similar cuando compararon la presencia de mutaciones en *KRAS* en el centro del tumor y en zonas periféricas (con una discordancia del 44%). Al-Mulla et al.³⁵² analizaron el estado mutacional de *KRAS* en 26 metástasis hepáticas y 31 muestras de ganglios linfáticos metastásicos y detectaron una tasa de discordancia global del 19% en comparación con el tumor primario. De la misma forma, la discordancia encontrada por Albanese et al. fue del 30% de su serie analizada³⁴⁷. Asimismo, Miranda et al.³⁵³ encontraron diferentes frecuencias de mutaciones en *KRAS* en 101 pacientes con CCR: ganglios linfáticos (19%), metástasis hepáticas (38%) y tumores primarios (32%). La menor incidencia mutacional en los ganglios linfáticos en comparación con los tumores primarios puede indicar una selección clonal en el tumor primario, donde las células neoplásicas que colonizan los ganglios linfáticos con mayor frecuencia, son aquellas que no presentan mutaciones en *KRAS*. Por otro lado, la presencia de mayores tasas de mutaciones en *KRAS* en las muestras metástasis hepáticas puede ser explicado por la adquisición gradual de mutaciones como una anomalía secundaria durante la progresión de la enfermedad. Otros genes implicados en la vía de señalización de EGFR (*NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*) han sido estudiados ampliamente en CCR esporádicos primarios. Mao et al.³⁴⁴ realizaron una revisión y meta análisis examinando la concordancia del estado mutacional de *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* entre tumores primarios y metástasis, encontrando altas tasas de concordancia entre ellos, pero baja con relación a las metástasis ganglionares. Más aun, Baldus et al.²³⁰ analizaron las mutaciones en estos tres genes en muestras pareadas de tumores primarios y metástasis ganglionares en 55 pacientes con CCR, encontrando discordancias para *KRAS* (31% de los casos), *BRAF* (4%) y *PIK3CA* (13%). Como hemos

demostrado previamente con técnicas de FISH y arrays de alta densidad²¹⁹ las metástasis de un individuo con CCR son, desde el punto de vista genético, extremadamente similares entre sí, pero son divergentes del tumor primario. Los eventos genéticos clonales particulares presentes en las muestras de metastásicas también se pueden encontrar en subclones restringidos del tumor primario, lo que sugiere que solo algunas células tumorales dentro del tumor primario tienen la capacidad de metastatizar, como se observa con cierta frecuencia en el meduloblastoma humano³⁵⁴, o bien clones de células tumorales presentes en el tumor primario que experimentan cambios genéticos adicionales en la periferia. De hecho, en nuestra serie, las mutaciones del gen *KRAS* fueron más frecuentes en las metástasis hepáticas (36%) que en sus correspondientes tumores primarios (16%). La mayor incidencia de mutaciones de *KRAS* en metástasis hepáticas indica que son mutaciones adquiridas. Existe un consenso general de que la progresión del cáncer surge de una única célula mutada, seguida de una expansión clonal asociada con alteraciones genéticas^{132,57}. La adquisición de estas alteraciones puede dar como resultado la aparición de nuevos subclones tumorales con diferentes genotipos^{355,356}. En este contexto, observamos que 13 de los 16 tumores primarios sin mutaciones en los genes analizados no cambiaron su perfil molecular durante la progresión de la enfermedad. Esto puede deberse a que los tumores están formados por un único clon no mutado y son genéticamente más estables. Varios estudios han examinado marcadores pronósticos después de la resección de metástasis hepáticas de CCR concluyendo que la estabilidad genética se asocia con un mejor pronóstico³⁵⁷.

Fue interesante observar que en 5 de los 11 casos que mostraron una evolución clonal lineal entre el tumor primario y la metástasis ganglionar, cuatro fueron clones WT. Como se ha discutido anteriormente^{230,353}, la menor incidencia de mutaciones en las metástasis ganglionares indica que estas metástasis son causadas por clones tumorales que escapan del tumor primario en las primeras etapas de la enfermedad, antes que ocurra el evento mutacional. Además, nuestro estudio pone de manifiesto que en el proceso metastásico se observa una selección clonal, donde se adquieren mutaciones durante la progresión tumoral. Por el contrario, los clones de células tumorales con mutaciones en *KRAS* se observan desde el comienzo o durante el proceso metastásico. Es bien sabido que las mutaciones en *RAS* y *BRAF* son mutuamente excluyentes²⁹⁴, pero nuestro estudio muestra que la presencia de una mutación en *KRAS* o *BRAF* en el tumor primario o en sitios metastásicos no excluye la presencia de la otra mutación en una ubicación diferente.

La presencia de mutaciones distintas entre las muestras del mismo paciente sugiere la existencia de diferentes clones de células tumorales en un mismo tumor y, a medida que progresa la enfermedad, se modifica el perfil mutacional de las células tumorales.

En la actualidad, el estudio mutacional de los genes *KRAS* y *NRAS* en el CCR se realiza de manera sistemática en la práctica clínica en tumores primarios⁹⁰ para el tratamiento con inhibidores de EGFR. En nuestra serie, 20 de los 26 pacientes no mostraron mutaciones para *KRAS* o *NRAS* en los tumores primarios y por tanto, hubieran sido candidatos para tratamientos con anticuerpos monoclonales. No obstante, cinco de estos 20 pacientes presentaban mutaciones en *KRAS* o *NRAS* bien en los ganglios linfáticos o en las metástasis hepáticas.

En resumen, la coexistencia de diferentes clones de células tumorales en una neoplasia maligna primaria y en sus correspondientes metástasis, junto con la evolución clonal del CCR podría explicar por qué algunos pacientes no responden a los inhibidores de EGFR, y confirmar la utilidad de evaluar mutaciones *KRAS* y *NRAS* no solo en tumores primarios, sino también en el resto de muestras tumorales.

PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO ASOCIADO AL PRONÓSTICO DEL CARCINOMA COLORRECTAL

Los pacientes con CCR esporádico que no presentan metástasis a distancia tanto en el momento del diagnóstico como durante el seguimiento de la enfermedad, a menudo se curan mediante resección quirúrgica del tumor primario con administración opcional de terapia adyuvante. Sin embargo, cuando se produce el proceso metastásico, habitualmente en el hígado, las posibilidades de curación se reducen drásticamente. Recientes estudios genéticos sugieren que el potencial metastásico radica en las anomalías genéticas/genómicas presentes en el propio tumor primario. En este sentido, recientemente nuestro grupo de investigación estableció que los tumores primarios del CCR metastásico presentan un perfil genético específico, definido por las ganancias de los cromosomas 7, 8q, 11q, 13q, 20q y X y las pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 8p, 17p y 18q. Aunque el conocimiento de los mecanismos genéticos subyacentes al proceso metastásico ha avanzado significativamente en los últimos años²²⁵, la expresión de los genes ubicados en estas regiones cromosómicas mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para la estratificación del riesgo de los pacientes sigue siendo controvertido^{358,359,360,361,362,363,364,365,366}. Probablemente debido a que los mecanismos celulares implicados en la génesis y la progresión tumoral dependen, no solo de las alteraciones genéticas propiamente dichas sino también, de la expresión de los genes codificantes de proteínas, y por ello, nos planteamos estudiar los perfiles de expresión génica de los CCR, empleando técnicas de IHQ, con el fin de entender mejor los mecanismos moleculares alterados en estos tumores, y la posible implicación en el pronóstico de la enfermedad. Para tal fin, estudiamos el perfil inmunohistoquímico de tumores primarios de CCR esporádicos metastásicos y no metastásicos. Además, una vez determinada la proteína con mayor relevancia pronóstica (EGFR), analizamos la correlación entre la expresión por IHQ con el número de copias del gen, niveles de ARNm y miARNs candidatos para su regulación. Para evitar los casos falsos negativos en el grupo de pacientes no metastásicos, solo se seleccionaron casos de CCR con un

seguimiento largo (mediana de seguimiento de 103 meses). De manera similar, sólo los pacientes con metástasis hepáticas que se habían sometido a una resección completa (R0) de sus tumores primarios y de las metástasis se incluyeron en el grupo de pacientes metastásicos. Para la caracterización inmunohistoquímica de ambos grupos de pacientes se utilizaron anticuerpos dirigidos a las proteínas más frecuentemente implicadas en el CCR^{367,368} y ubicadas en regiones cromosómicas previamente descritas en la progresión de la enfermedad. En estudios previos se ha observado que los CCR con metástasis hepáticas y CCR no metastásicos^{359,369} comparten un patrón similar de expresión inmunohistoquímica de proteínas; esta observación fue confirmada por nuestro grupo, donde observamos que el patrón inmunohistoquímico detectado para los tumores metastásicos vs. no metastásicos fueron similares para la expresión de la mayoría de los anticuerpos analizados. Así, ambos grupos de pacientes mostraron altos niveles de c-Myc y p53, negatividad para Her2 y expresión de Ki-67 $\leq 50\%$, entre otros. Por el contrario, la expresión de las proteínas MLH1, PMS2, CEA y EGFR fueron significativamente más prevalentes, o incluso exclusivos de los tumores metastásicos. Esta diferencia de expresión proteica apoya un papel potencial para estas cuatro proteínas en el proceso metastásico del CCR.

La literatura muestra que mediante técnicas de IHQ la presencia de inestabilidad de microsatélites (MSI) causada por la pérdida de la actividad de reparación del desemparejamiento del ADN (MMR) está presente en el 15% de los tumores metastásicos^{370,371}. En línea con estos y otros estudios^{371,372,373}, y utilizando métodos similares, nuestros resultados detectaron la presencia de MSI en el 16% de los casos de CCR esporádicos estudiados, siendo significativamente mayor en el grupo de pacientes no metastásicos. Varios estudios han demostrado que la inestabilidad de los microsatélites en el CCR esporádico proporciona información pronóstica útil³⁷², indicándonos que los pacientes con MSI muestran una SG más larga y una respuesta modificada a la quimioterapia convencional. En la actualidad es bien conocido que la MSI un marcador predictivo de resistencia a la quimioterapia adyuvante estándar basada en 5-FU³⁷⁴. Sin embargo, la información pronóstica que nos proporciona de los carcinomas con MSI es altamente discutible; varios estudios han demostrado que los carcinomas con MSI tienen un comportamiento clínico similar a los carcinomas con estabilidad de microsatélites (MSS), y el beneficio clínico se ha observado solo en los tumores en estadio II³⁷⁵. En este sentido, la ventaja pronóstica derivada de la MSI en el resto de estadios continua siendo

controvertida, aunque se han propuesto como posibles responsables del comportamiento clínico la infiltración linfocítica intensa, una mayor tasa de apoptosis y la aparición infrecuente de pérdidas alélicas o mutaciones en *TP53*, *DCC*, *KRAS* y *BRAF*^{376,377,378}.

El documento de consenso del Colegio Americano de Patólogos publicado en 1999 ya indicó que el estadio TNM, la presencia de invasión tumoral venosa extramural y el nivel sérico preoperatorio de CEA son los factores pronósticos más importantes del CCR⁶⁹. Está bien establecido que el nivel sérico preoperatorio de CEA es un importante factor pronóstico^{69,379}, niveles superiores a 5ng/ml se relacionan con un pronóstico adverso. De hecho, recientemente describimos la alta prevalencia de niveles séricos de CEA altos (≥ 7.5 ng / ml) en la gran mayoría de los pacientes con CCR con metástasis hepáticas sincrónicas²⁹⁶. De acuerdo con los hallazgos de estudios previos que utilizaron técnicas IHQ³⁶⁶, observamos una expresión de CEA significativamente mayor entre los pacientes con tumores metastásicos en comparación con los pacientes con tumores no metastásicos. El CEA está involucrado en la adhesión celular, protegiendo las células de anoikis (apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular)³⁸⁰, lo que favorece el potencial metastásico de la célula. Además, el CEA se puede unir a las células de Kupffer³⁸¹, modular la respuesta inflamatoria en el hígado y proteger las células tumorales de los radicales de oxígeno³⁸². Por otra parte, estudios in vitro han demostrado resistencia de las células que expresan CEA a la lisis inducida por células asesinas activadas (células LAK)³⁸³. Estas funciones biológicas de CEA explicarían por qué los tumores con expresión más fuerte tienen mayor potencial metastásico.

Además de encontrar asociación entre la expresión de CEA y el proceso metastásico, también identificamos una asociación entre la expresión de EGFR y el pronóstico de la enfermedad. Observamos que la expresión IHQ de EGFR es un factor pronóstico independiente de la enfermedad, de acuerdo con publicaciones previas en las que se ha analizado EGFR mediante técnicas de IHQ y que han mostrado una correlación entre la expresión de EGFR y la presencia de metástasis hepáticas en pacientes con CCR^{384,385}. En la misma línea, nosotros también encontramos que los tumores con alta positividad para EGFR presentaban metástasis ganglionares y un estadio TNM avanzado en el momento del diagnóstico. Del mismo modo, Goos et al.³⁸⁶ publicó en una serie de 323 pacientes con CCR metastásico, que aquellos que expresaban de manera intensa EGFR tuvieron un peor pronóstico. Otros estudios han encontrado una correlación entre la

expresión de EGFR y la progresión de la enfermedad^{385,387,388}, la diseminación metastásica^{366,389,390} y un pronóstico adverso³⁹¹. Además, Du P et al.³⁹⁰, sugirieron que EGFR juega un papel relevante en la angiogénesis de los tumores en estadios tempranos. Sin embargo, otros autores han mostrado resultados controvertidos al evaluar la expresión de EGFR mediante IHQ y su correlación con el pronóstico de la enfermedad. Así, Tsai et al.³⁹² no encontraron diferencias en la expresión de EGFR entre tumores de diversos grados y estadios, o en la supervivencia, a pesar de analizar una gran serie de pacientes (n = 150). Esto podría deberse a que los casos con positividad para EGFR se clasificaron en tres categorías (1+, 2+ y 3+), en lugar de clasificarse como positivos o negativos, como hemos presentamos en nuestro estudio.

En nuestro trabajo también encontramos correlaciones significativas entre la expresión del gen EGFR por IHQ y la detectada mediante arrays de expresión de oligonucleótidos. Asimismo encontramos una asociación significativa entre el número de copias de EGFR detectada por FISH y por arrays de SNPs. Este es el primer estudio en el que la expresión IHQ de EGFR se ha validado mediante tres técnicas moleculares en tumores metastásicos y no metastásicos. De acuerdo con otros estudios, se observó que los tumores con sobreexpresión de EGFR mostraron la amplificación del gen y/o una alta frecuencia de polisomías del cromosoma 7, especialmente entre los tumores colorrectales metastásicos^{389,393,394,395}. En este sentido, otros estudios han puesto de manifiesto que pacientes con CCR diagnosticados como EGFR-positivos por FISH también responden al tratamiento con cetuximab en monoterapia^{394,395}. De hecho, en cultivo se ha visto que la dosis de cetuximab que inhibe la proliferación en poblaciones de células de CCR metastásico con amplificación de EGFR, no es efectiva en poblaciones de células con un número normal de copias para el gen EGFR. Moroni M *et al.* encontraron que en ocho de nueve pacientes con respuestas objetivas a inhibidores de EGFR que pudieron ser evaluados por FISH mostraron ganancias para EGFR, lo que sugiere que la selección de casos para la terapia anti-EGFR puede basarse en el número de copias del gen EGFR³⁹⁴. Nuestros hallazgos muestran que la amplificación génica, la regulación positiva de la transcripción, la estructura anormal del receptor secundaria a las alteraciones genéticas (p. ej., mutación y polimorfismo) o los niveles de miARN específicos podrían ser responsables de la sobreexpresión de EGFR y, por lo tanto, factores predictivos del pronóstico de la enfermedad^{396,397}.

También identificamos dos miARNs, miR-134 y miR-4328, como posibles reguladores de EGFR en tumores no metastásicos y metastásicos, respectivamente. Estudios anteriores han confirmado que ambos miARNs tienen funciones importantes en la progresión del CCR. Estos estudios resaltan la posibilidad de que, además de los inhibidores de la tirosina quinasa y los anticuerpos monoclonales clásicos para terapias dirigidas a EGFR, la terapia génica basada en estos miARNs podría ser eficaz en el silenciamiento de EGFR. Cabe señalar que el miARN-134 tiene funciones importantes en el cáncer, tales como la regulación de la proliferación celular^{398,399}, la migración³⁹⁸, la invasión³⁹⁸ y su implicación en la transición epitelio-mesenquima^{400,401}. Qin et al.⁴⁰², utilizando una inyección intratumoral de miR-134, observaron una reducción en la expresión de EGFR en líneas celulares de carcinoma de pulmón no microcítico, lo que sugiere que el uso de miR-134 podría ser una potencial estrategia potencial en la terapia dirigida a EGFR. Sherien et al.⁴⁰³ demostraron que el miARN-134 es un potencial supresor tumoral y podría ser fundamental para el bloqueo de la tumorigénesis del CCR a través de su capacidad para regular de manera coordinada la cascada de señalización del EGFR al dirigirse de forma independiente a EGFR y PIK3CA.

En nuestra serie encontramos que en los tumores metastásicos la sobreexpresión de EGFR fue más alta que en los tumores no metastásicos, probablemente como consecuencia de la amplificación génica o una alta frecuencia de polisomías del cromosoma 7. Curiosamente, las interacciones de las parejas miARN-mARN (inversamente correlacionados) en la serie de pacientes metastásicos revelaron que el miARN-4328 es un posible regulador de la expresión de EGFR. Hay escasa información disponible sobre este miARN en pacientes con CCR. No obstante, el miARN-4238 ha sido descrito por otros autores como un regulador de EGFR en adenocarcinomas de pulmón con EGFR mutado⁴⁰⁴. Sin embargo, se necesitan estudios expresión génica adicionales y estudios funcionales, así como una comparación directa de tumores no metastásicos y metastásicos para confirmar nuestras observaciones y proporcionar una visión más profunda del papel del miARN-4328 en pacientes con CCR metastásico.

En resumen, en el presente estudio, mostramos que la expresión de la proteína EGFR y el número de copias están estrechamente relacionados. La expresión de EGFR es un factor pronóstico independiente para la SG en pacientes con CCR. La expresión del gen EGFR podría estar regulada por mecanismos de amplificación o por una alta frecuencia de

polisomías del cromosoma 7 en tumores metastásicos, o por miARNs (miARN-134) en tumores no metastásicos. También mostramos que expresión de EGFR en pacientes con CCR está intrínsecamente relacionada con un mayor potencial metastásico y un pronóstico adverso, y que además proporciona información pronóstica adicional sobre el estadio pTNM.

VI. CONCLUSIONES

En relación con la detección de mutaciones mediante NGS y su impacto pronóstico:

1. La presencia de mutaciones en genes asociados a vías de señalización EGFR es un hallazgo frecuente en el CCR, siendo las mutaciones en *KRAS*, las anomalías genéticas más habituales; con menor frecuencia, se observa mutaciones a nivel del gen *NRAS*. Las mutaciones de *KRAS* se encontraron preferentemente en tumores localizados en el lado derecho, bien diferenciados y en ausencia de invasión linfovascular.

2. Las mutaciones en *BRAF* (V600E) son más frecuentes en tumores pobremente diferenciados, presencia de carcinomatosis peritoneal e inestabilidad de microsatélites. La presencia de mutaciones en *BRAF* confiere mal pronóstico a los pacientes con CCR esporádico.

3. El estado mutacional de *BRAF*, junto con el estadio TNM, permitiría la identificación, en el momento del diagnóstico, de un subgrupo de pacientes con CCR (pacientes en estadio IV y pacientes en estadio III más mutación en *BRAF*) en los que, a pesar de conseguir la resección completa del tumor, presentarían un alto riesgo de recurrencia durante los primeros dos primeros años después del diagnóstico.

En relación con los diferentes perfiles mutacionales detectados en tumor primario, ganglios metastásicos y metástasis hepáticas:

4. Existen diferencias en los perfiles mutacionales en tumores primarios, metástasis ganglionares y metástasis hepáticas.

5. La adquisición de mutaciones en genes implicados en la vía EGFR en metastásis (hepáticas y ganglionares) podría explicar por qué no todos los pacientes responden a tratamientos con inhibidores de EGFR. Creemos necesario el análisis mutacional en todas las muestras tumorales disponibles de los pacientes antes de decidir el tratamiento anti-EGFR.

En relación con la expresión inmunohistoquímica del CCR:

6. La expresión de EGFR podría ayudar a diferenciar en el momento del diagnóstico a aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de desarrollar procesos metastásicos. La expresión de EGFR es un factor de pronóstico adverso independiente para la SG de los pacientes con CCR.

7. La expresión IHQ de EGFR está relacionada con el número de copias del gen y con las polisomías del cromosoma 7, así como con los niveles de mRNA.

8. Identificamos dos miARN (miARN-134 y miARN-4328) como posibles candidatos de la regulación de EGFR en CCR.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. *Colorectal Cancer Source: Globocan 2018 Number of New Cases in 2018, Both Sexes, All Ages.*; 2018.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. September 2018.
4. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-193.
5. Cáncer colorrectal: Estadísticas | Cancer.Net. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-colorrectal/estadísticas>.
6. Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. 2006;16(7):8-3.
7. Kelly ME, Spolverato G, Lê GN, et al. Synchronous colorectal liver metastasis: A network meta-analysis review comparing classical, combined, and liver-first surgical strategies. *J Surg Oncol*. 2015;111(3):341-351.
8. McMillan DC, McArdle CS. Epidemiology of colorectal liver metastases. *Surg Oncol*. 2007;16(1):3-5.
9. Zampino MG, Maisonneuve P, Ravenda PS, et al. Lung Metastases From Colorectal Cancer: Analysis of Prognostic Factors in a Single Institution Study. *Ann Thorac Surg*. 2014;98:1238-1245.
10. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer OPEN. *Nat Publ Gr*. 2016.
11. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030-1047.
12. Siegel R, Jemal A. Cancer Facts & Figures. *Health Policy (New York)*. 2010;1(1):1-68.

13. Truswell AS. Meat consumption and cancer of the large bowel. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56 Suppl 1:S19-24.
14. IARC IA for R on C. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans Volumes 1 to 114 * List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans , Volumes 1 to 114 *. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans.* 2014;1 a 114:1-12.
15. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(4):265-273.
16. Giovannucci E. An Updated Review of the Epidemiological Evidence that Cigarette Smoking Increases Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(7):725-731.
17. Joshi CE, Parmigiani G, Colditz G a, Platz E a. Opportunities for the primary prevention of colorectal cancer in the United States. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(1):138-145.
18. Cancer - The Health Consequences of Smoking - NCBI Bookshelf.
19. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer.* 2004;108(3):433-442.
20. Giovannucci E. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control.* 1995;6(2):164-179.
21. Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC, Ritchie JK, Williams CB. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut.* 1990;31:800-806.
22. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Perspectives in Pathology Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease : 1967:931.
23. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews H a, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut.* 1994;35:1590-1592.
24. Tsunoda A, Shibusawa M, Kawamura M, Marumori T, Kusano M, Ohta H. Colorectal cancer after pelvic irradiation: Case reports. *Anticancer Res.* 1997;17(1 B):729-732.
25. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(11):916-932.
26. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA.* 2005;294(22):2849-2857.
27. Hill MJ. Vegetables, fruits, fibre and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2002;11(1):1-2.

28. Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, et al. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes Control*. 2010;21(11):1919-1930.
29. Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol*. 2002;3(3):166-174.
30. Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clin Colorectal Cancer*. 2016;15(1):67-73.
31. Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(10):3039-3045.
32. Saidi HS, Karuri D, Nyaim EO. Correlation of clinical data, anatomical site and disease stage in colorectal cancer. *East Afr Med J*. 2008;85(6):259-262.
33. Loeve F, Boer R, van Oortmarssen GJ, van Ballegooijen M, Habbema JD. The MISCAN-COLON simulation model for the evaluation of colorectal cancer screening. *Comput Biomed Res*. 1999;32(1):13-33.
34. Lansdorp-Vogelaar I, Knudsen AB, Brenner H. Cost-effectiveness of colorectal cancer screening. *Epidemiol Rev*. 2011;33(1):88-100.
35. Song L-L, Li Y-M. Current noninvasive tests for colorectal cancer screening: An overview of colorectal cancer screening tests. *World J Gastrointest Oncol*. 2016;8(11):793-800.
36. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, et al. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet*. 1996;348(9040):1472-1477.
37. Segnan N, Armaroli P, Bonelli L, et al. Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: Follow-up findings of the italian randomized controlled trial - SCORE. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(17):1310-1322.
38. Valori R, Rey J-F, Atkin W, et al. *Quality Assurance in Endoscopy in Colorectal Cancer Screening and Diagnosis*; 2010.
39. Programa E. El cáncer del cáncer. <http://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/programas-guias-clinicas/programas-salud/programa-deteccion-precoz-cancer-colorrectal-castilla-leon>.
40. Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(33):5313-5327. .
41. Swiderska M, Choromańska B, Dąbrowska E, et al. The diagnostics of colorectal cancer. *Contemp Oncol (Poznan, Poland)*. 2014;18(1):1-6.

42. Fukuda I, Yamakado M, Kiyose H. Influence of smoking on serum carcinoembryonic antigen levels in subjects who underwent multiphasic health testing and services. *J Med Syst.* 1998;22(2):89-93.
43. Jia S, Zhang R, Li Z, Li J. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(33):55632-55645.
44. Arneth B. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC Cancer.* 2018;18(1):527.
45. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781-791.
46. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3213-3221.
47. Zhao R, Cai Z, Li S, et al. Expression and clinical relevance of epithelial and mesenchymal markers in circulating tumor cells from colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(6):9293-9302.
48. Lecomte T, Ceze N, Dorval É, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroentérologie Clin Biol.* 2010;34(12):662-681.
49. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):426-437.
50. Fleischhacker M, Schmidt B. Cell-free DNA resuscitated for tumor testing. *Nat Med.* 2008;14(9):914-915.
51. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 2014;20(4):430-435.
52. Matsumura T, Sugimachi K, Inuma H, et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2015;113(2):275-281.
53. Chen Y, Xie Y, Xu L, et al. Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics. *Int J Cancer.* 2017;140(4):900-913.
54. Nascimbeni, Riccardo M.D.; Villanacci, Vincenzo M.D.; Mariani, Pier Paolo M.D.; Di Betta, Ernesto M.D.; Ghirardi, Mauro M.D.; Donato, Francesco M.D.; Salerni BMD. Aberrant Crypt Foci in the Human Colon: Frequency and Histol...: The American Journal of Surgical Pathology. *Am J Surg Pathol.* 1996;23(10):1256.
55. M R Nucci , C R Robinson , P Longo , P Campbell SRH. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Aberrant Crypt Foci in Human Colorectal Mucosa - Journals - NCBI. *Hum Pathol.* 1997;28(12):1396-1407.

56. Lance P, Hamilton SR. Sporadic Aberrant Crypt Foci Are Not a Surrogate Endpoint for Colorectal Adenoma Prevention.
57. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-767.
58. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* (80-). 2013;339(6127):1546-1558.
59. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel, Switzerland)*. 2018;6(2).
60. Homas T, Mperiale FI, Agner ARW, et al. RESULTS OF SCREENING COLONOSCOPY AMONG PERSONS 40 TO 49 YEARS OF AGE. *N Engl J Med*. 2002;346(23).
61. Stefania Fossi, M.D., Franco Bazzoli, M.D., Luigi Ricciardiello, M.D., Gianni Nicolini MD, Rocco Maurizio Zagari, M.D., Paolo Pozzato, M.D., Domenico Palli, M.D., and Enrico Roda MD. Incidence and Recurrence Rates of Colorectal Adenomas in First-Degree Asymptomatic Relatives of Patients With Colon Cancer. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(5).
62. ERic R. FEARON, STANLEY R. HAMILTON BV. Clonal Analysis of Human Colorectal Tumors. *Sci New Ser*. 1987;238(4824):193-197.
63. Parra-Blanco A, Gimeno-García AZ, Nicolás-Pérez D, et al. Risk for high-grade dysplasia or invasive carcinoma in colorectal flat adenomas in a Spanish population. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29(10):602-609.
64. O'brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, et al. Flat adenomas in the National Polyp Study: is there increased risk for high-grade dysplasia initially or during surveillance? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(10):905-911.
65. Loeve F, Van Ballegooijen M, Boer R, Kuipers EJ, Habbema JDF. Colorectal cancer risk in adenoma patients: A nation-wide study. *Int J Cancer*. 2004;111(1):147-151.
66. Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello FM, Johnson DA, Levin TR. AGA Guidelines for Colonoscopy Surveillance After Screening and Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. 2012.
67. Vajpeyi R. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *J Clin Pathol*. 2005;58:671-672.
68. Odze... RD. Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas. *books.google.com*. 2009.
69. Compton CC, Compton CC, Fielding LP, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):979-994.

70. (AJCC) AJC on C. *AJCC Cancer Staging Manual.*; 2017.
71. International Agency for Research on Cancer. World Cancer report 2008. *Cancer Control.* 2008;199:512.
72. Andrici J, Farzin M, Sioson L, et al. Mismatch repair deficiency as a prognostic factor in mucinous colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2016;29(3):266-274.
73. García-Solano J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, et al. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2010;41(10):1359-1368.
74. Haupt B, Ro JY, Schwartz MR, Shen SS. Colorectal adenocarcinoma with micropapillary pattern and its association with lymph node metastasis. *Mod Pathol.* 2007;20(7):729-733.
75. Chandler I, Houlston RS. Interobserver agreement in grading of colorectal cancers—findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology.* 2008;52(4):494-499.
76. Cho YB, Chun H-K, Yun HR, Kim HC, Yun SH, Lee WY. Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology.* 56(94-95):1335-1340.
77. Derwinger K, Kodeda K, Bexé-Lindskog E, Taflin H. Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer. *Acta Oncol (Madr).* 2010;49(1):57-62.
78. Jass JR, O'Brien MJ, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* 2007;450(1):1-13.
79. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor “budding” in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1993;36(7):627-635.
80. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2013;44(5):697-705.
81. Shepherd N, Baxter K, Love S. The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: A prospective evaluation. *Gastroenterology.* 1997;112(4):1096-1102.
82. Sloothaak DAM, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, et al. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(3):263-269.
83. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: Impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg.* 1990;77(11):1241-1246.

84. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines. Colon cancer.
85. Nelson H, Petrelli N, Carlin A, et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(8):583-596.
86. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol.* 2007;25(22):3238-3245.
87. Fonseca GM, Herman P, Faraj SF, et al. Pathological factors and prognosis of resected liver metastases of colorectal carcinoma: implications and proposal for a pathological reporting protocol. *Histopathology.* 2018;72(3):377-390.
88. Yoh T, Yamamichi K, Oishi M, Iwaki R, Motohiro T. [A case of effective neoadjuvant chemoradiotherapy with capecitabine for locally advanced sigmoid colon cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2011;38(6):1021-1024.
89. Ohhara Y, Fukuda N, Takeuchi S, et al. Role of targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2016;8(9):642-655.
90. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016
91. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1182-1191.
92. Westdorp H, Fennemann FL, Weren RDA, et al. Opportunities for immunotherapy in microsatellite instable colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(10):1249-1259.
93. Emambux S, Tachon G, Junca A, Tougeron D. Results and challenges of immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2018;18(5):561-573.
94. Dudley JC, Lin M-T, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res.* 2016;22(4):813-820.
95. Langner C, Schneider N. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. *Cancer Manag Res.* 2014;6:291.
96. Smith MD, McCall JL. Systematic review of tumour number and outcome after radical treatment of colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2009;96(10):1101-1113.
97. Mukkai Krishnamurty D, Wise PE. Importance of surgical margins in rectal cancer. *J Surg Oncol.* 2016;113(3):323-332.
98. Sinicrope FA, Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Curr Opin Oncol.* 2009;21(4):369-373.
99. Kim CG, Ahn JB, Jung M, et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *Br J Cancer.* 2016;115(1):25-33.

100. Cicenas J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Med Oncol*. 2017;34(2):26.
101. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol (Madr)*. 2014;53(7):852-864.
102. Clarke CN, Kopetz ES. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6(6):660-667.
103. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Expanding Role of Microsatellite Instability in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancers. *J Gastrointest Cancer*. 2017;48(4):305-313.
104. Wu Q, Hu T, Zheng E, Deng X, Wang Z. Prognostic role of the lymphocyte-to-monocyte ratio in colorectal cancer: An up-to-date meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(22):e7051.
105. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol*. 2010;222(4):350-366.
106. Koudougou C, Bonneville M, Matysiak-Budnik T, Toucheffeu Y. Review article: antitumoural immunity in colorectal cancer - current and potential future implications in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(1):3-15.
107. Zhang X, Kelaria S, Kerstetter J, Wang J. The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6(3):307-313.
108. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. Intraepithelial Effector (CD3+)/Regulatory (FoxP3+) T-Cell Ratio Predicts a Clinical Outcome of Human Colon Carcinoma. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1270-1279.
109. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology*. 2001;121(1):198-213.
110. Pineda M, González S, Lázaro C, Blanco I, Capellá G. Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res*. 2010;693(1-2):19-31.
111. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-170.
112. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):769-780.
113. Macaron C, Heald B, Burke CA. Using Genetics to Identify Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes in Your Patient. *Curr Gastroenterol Rep*. 2015;17(10):463.

114. Lynch HT, Guirgis HA, Lynch PM, Lynch JF, Harris RE. Familial cancer syndromes: a survey. *Cancer*. 1977;39(4 Suppl):1867-1881.
115. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2014;147(2):502-526.
116. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):153-158.
117. Yurgelun MB, Goel A, Hornick JL, et al. Microsatellite Instability and DNA Mismatch Repair Protein Deficiency in Lynch Syndrome Colorectal Polyps. *Cancer Prev Res*. 2012;5(4):574-582.
118. Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer*. 2006;5(3):221-226.
119. Steven M. Powell, Gloria M. Petersen, Anne J. Krush, Susan Booker, Jin Jen, Francis M. Giardiello, Stanley R. Hamilton, Bert Vogelstein KWK. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *New Engl J Med Downloaded from nejm.org April*. 1993.
120. Waller A, Findeis S, Lee M. Familial Adenomatous Polyposis. *J Pediatr Genet*. 2016;5(2):078-083.
121. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(7):3046-3050.
122. McGarrity TJ, Amos C. Peutz-Jeghers syndrome: clinicopathology and molecular alterations. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(18):2135-2144.
123. Yoo LI, Chung DC, Yuan J. LKB1--a master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):529-535.
124. Wirtzfeld DA, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA. Hamartomatous Polyposis Syndromes: Molecular Genetics, Neoplastic Risk, and Surveillance Recommendations. *Ann Surg Oncol*. 2001;8(4):319-327.
125. Schultz KAP, Rednam SP, Kamihara J, et al. *PTEN*, *DICER1*, *FH* , and Their Associated Tumor Susceptibility Syndromes: Clinical Features, Genetics, and Surveillance Recommendations in Childhood. *Clin Cancer Res*. 2017;23(12):e76-e82.
126. Brosens LA, Langeveld D, van Hattem WA, Giardiello FM, Offerhaus GJA. Juvenile polyposis syndrome. *World J Gastroenterol*. 2011;17(44):4839-4844.
127. Dominguez-Valentin M, Therkildsen C, Veerla S, et al. Distinct gene expression signatures in lynch syndrome and familial colorectal cancer type x. *PLoS One*. 2013;8(8):e71755.

128. Francisco I, Albuquerque C, Lage P, et al. Familial colorectal cancer type X syndrome: two distinct molecular entities? *Fam Cancer*. 2011;10(4):623-631.
129. Sánchez-Tomé E, Rivera B, Perea J, et al. Genome-wide linkage analysis and tumoral characterization reveal heterogeneity in familial colorectal cancer type X. *J Gastroenterol*. 2015;50(6):657-666.
130. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6(1):479-507.
131. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. In: *9a Ed. Elsevier*. ; 2015:836-842.
132. Rubin CM. The Genetic Basis of Human Cancer. *Ann Intern Med*. 1998;129(9):759.
133. Loeb LA. Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis. *Cancer Res*. 1991;51(12).
134. Lin J-K, Chang S-C, Yang Y-C, Li AF-Y. Loss of heterozygosity and DNA aneuploidy in colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2003;10(9):1086-1094.
135. Leary RJ, Lin JC, Cummins J, et al. Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(42):16224-16229.
136. Kang GH. Four Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Precursor Lesions. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135:698-703.
137. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. 2002;89(7):845-860.
138. Chiang JM, Chou YH, Chou TB. K-ras codon 12 mutation determines the polypoid growth of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(15):3289-3293.
139. Al-Shamsi HO, Jones J, Fahmawi Y, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, TP53, and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: determination of frequency and distribution pattern. *J Gastrointest Oncol*. 2016;7(6):882-902.
140. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):22976-22988.
141. Lin G, Zheng X-W, Li C, Chen Q, Ye Y-B. KRAS mutation and NF- κ B activation indicates tolerance of chemotherapy and poor prognosis in colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 2012;57(9):2325-2333.
142. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: rectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009;7(8):838-881.
143. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009;7(8):778-831.

144. Fakih MG. Metastatic Colorectal Cancer: Current State and Future Directions. *J Clin Oncol*. 2015;33(16):1809-1824.
145. Caron de Fromental C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992;4(1):1-15.
146. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, et al. The TP53 Colorectal Cancer International Collaborative Study on the Prognostic and Predictive Significance of *p53* Mutation: Influence of Tumor Site, Type of Mutation, and Adjuvant Treatment. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7518-7528.
147. Sefrioui D, Vermeulin T, Blanchard F, et al. Copy number variations in DCC/18q and ERBB2/17q are associated with disease-free survival in microsatellite stable colon cancer. *Int J cancer*. 2017;140(7):1653-1661.
148. Hermsen M, Postma C, Baak J, et al. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1109-1119.
149. Wang H, Liang L, Fang J-Y, Xu J. Somatic gene copy number alterations in colorectal cancer: new quest for cancer drivers and biomarkers. *Oncogene*. 2016;35(16):2011-2019.
150. Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, et al. Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol*. 1998;51(12):901-909.
151. González-González M, Fontanillo C, Abad MM, et al. Identification of a characteristic copy number alteration profile by high-resolution single nucleotide polymorphism arrays associated with metastatic sporadic colorectal cancer. *Cancer*. 2014;120(13):1948-1959.
152. González-González M, Muñoz-Bellvis L, Mackintosh C, et al. Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as assessed by interphase FISH in sporadic colorectal carcinomas. Ashktorab H, ed. *PLoS One*. 2012;7(8):e42683.
153. Lee KS, Kwak Y, Nam KH, et al. c-MYC Copy-Number Gain Is an Independent Prognostic Factor in Patients with Colorectal Cancer. Krieg A, ed. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139727.
154. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Copped F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011.
155. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, et al. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2013;73(2):725-735.
156. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. 2016;13(1):120-135.
157. Plentz RR, Wiemann SU, Flemming P, et al. Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut*. 2003;52(9):1304-1307.

158. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012;18(6):1506-1512.
159. Vasen HFA, Möslein G, Alonso A, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet.* 2007;44(6):353-362.
160. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer.* 1999;35(14):1986-2002.
161. Sameer AS, Nissar S, Fatima K. Mismatch repair pathway: Molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23(4):246-257.
162. Lanza G, Gafà R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini L. Immunohistochemical Pattern of MLH1/MSH2 Expression Is Related to Clinical and Pathological Features in Colorectal Adenocarcinomas with Microsatellite Instability. *Mod Pathol.* 2002;15(7):741-749.
163. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1994;145(1):148-156.
164. Jover R, Zapater P, Castells A, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer.* 2009;45(3):365-373.
165. Shen L, Toyota M, Kondo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(47):18654-18659.
166. Toyota M, Issa J-PJ. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(5):349-357.
167. Ogino S, Odze RD, Kawasaki T, et al. Correlation of Pathologic Features With CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) by Quantitative DNA Methylation Analysis in Colorectal Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(9):1175-1183.
168. Myä Håñnen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation Can Selectively Silence Individual pltfnk4A AlÃ-elesin Neoplasia1. *CANCER Res.* 1998;58:591-593.
169. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16365-16385.
170. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-867.
171. Fodde R, Smits R, Clevers H, Nollet F, Roy F van, Slattery ML. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38(7):867-871.
172. Kinzler KW, Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 1997;386(6627):761-763.

173. Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, et al. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*. 1996;110(3):669-674.
174. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler3 KW, Howard T. Mutational Analysis of the APC//3-Catenin/Tcf Pathway in Colorectal Cancer1. *CANCER Res*. 1998;5814:1130-11.
175. Firestein R, Bass AJ, Kim SY, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature*. 2008;455(7212):547-551.
176. Shin H-J, Baek K-H, Jeon A-H, et al. Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability.
177. Kwon C, Cheng P, King IN, et al. Notch post-translationally regulates β -catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat Cell Biol*. 2011;13(10):1244-1251.
178. Dustin A, Deming, Alyssa A, Leystra, Laura Nettekoven, Chelsea Sievers D, Miller, Malisa Middlebrooks, Linda Clipson, Dawn Albrecht, Jeff Bacher MK, Washington, Jamey Weichert and RBH. PIK3CA and APC Mutations are Synergistic in the Development of Intestinal Cancers. *Oncogene*. 2014;33(17):2245-2254.
179. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S, Fang J. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011;12(6):594-603.
180. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27(41):5497-5510.
181. Bohn BA, Mina S, Krohn A, et al. Altered PTEN function caused by deletion or gene disruption is associated with poor prognosis in rectal but not in colon cancer. *Hum Pathol*. 2013;44(8):1524-1533.
182. Di Fiore F, Sesboué R, Michel P, Sabourin JC, Frebourg T. Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010;103(12):1765-1772.
183. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin Use, Tumor PIK3CA Mutation, and Colorectal-Cancer Survival.
184. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2014;4(March):35.
185. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-532.
186. Malumbres M, Barbacid M. Timeline: RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):459-465.

187. Guerrero S, Casanova I, Farré L, Mazo A, Capellà G, Mangués R. K-ras Codon 12 Mutation Induces Higher Level of Resistance to Apoptosis and Predisposition to Anchorage-independent Growth Than Codon 13 Mutation or Proto-Oncogene Overexpression. *Cancer Res.* 2000;60(23).
188. Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell.* 2004;116(2 Suppl):S67-9, 1 p following S69.
189. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med.* 2010;9(45):145-152.
190. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. p53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Res.* 1990;50(23).
191. Risio M, Casorzo L, Chiecchio L, De Rosa G, Rossini FP. Deletions of 17p are associated with transition from early to advanced colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;147(1):44-49.
192. Clausen OP, Lothe RA, Børresen-Dale AL, et al. Association of p53 accumulation with TP53 mutations, loss of heterozygosity at 17p13, and DNA ploidy status in 273 colorectal carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 1998;7(4):215-223.
193. Ramamoorthi G, Sivalingam N. Molecular mechanism of TGF- β signaling pathway in colon carcinogenesis and status of curcumin as chemopreventive strategy. *Tumour Biol.* 2014;35(8):7295-7305.
194. Bellam N, Pasche B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat Res.* 2010;155:85-103.
195. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell.* 2012;22(5):571-584.
196. Soleimani A, Pashirzad M, Avan A, Ferns GA, Khazaei M, Hassanian SM. Role of the transforming growth factor- β signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Cell Biochem.* December 2018;jcb.28331.
197. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008;134(2):215-230.
198. Abetov D, Mustapova Z, Saliev T, Bulanin D. Biomarkers and signaling pathways of colorectal cancer stem cells. *Tumour Biol.* 2015;36(3):1339-1353.
199. Vinson KE, George DC, Fender AW, Bertrand FE, Sigounas G. The Notch pathway in colorectal cancer. *Int J cancer.* 2016;138(8):1835-1842.
200. Fender AW, Nutter JM, Fitzgerald TL, Bertrand FE, Sigounas G. Notch-1 promotes stemness and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2015;116(11):2517-2527.
201. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol.* 2003;53:1-114.

202. Zhang X, Zhang S-S, Wei G-J, Deng Z-M, Hu Y. Dysregulation of hedgehog signaling pathway related components in the evolution of colonic carcinogenesis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(11):21379-21385.
203. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J basic Med Sci*. 2018;18(1):8-20.
204. Wang D, Hu G, Du Y, et al. Aberrant activation of hedgehog signaling promotes cell proliferation via the transcriptional activation of forkhead Box M1 in colorectal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):23.
205. Varnat F, Duquet A, Malerba M, et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*. 2009;1(6-7):338-351.
206. Hong KD, Lee Y, Kim B-H, Lee S Il, Moon HY. Expression of GLI1 correlates with expression of lymphangiogenesis proteins, vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3, in colorectal cancer. *Am Surg*. 2013;79(2):198-204.
207. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-6684.
208. Slattery ML, Mullany LE, Sakoda L, et al. The NF- κ B signalling pathway in colorectal cancer: associations between dysregulated gene and miRNA expression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(2):269-283.
209. Hassanzadeh P. Colorectal cancer and NF- κ B signaling pathway. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench*. 2011;4(3):127-132.
210. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF- κ B Signaling Pathway, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cell Mol Immunol*. 2010;6(5):327-334.
211. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(9):1315-29, 1330.
212. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: A meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer*. 2010;46(15):2788-2798.
213. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(3):153-162.
214. Grade M, Becker H, Liersch T, Ried T, Ghadimi BM. Molecular cytogenetics: genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact. *Cell Oncol*. 2006;28(3):71-84.
215. Vignot S, Lefebvre C, Frampton GM, et al. Comparative analysis of primary tumour and matched metastases in colorectal cancer patients: evaluation of concordance between genomic and transcriptional profiles. *Eur J Cancer*. 2015;51(7):791-799.

216. Xie T, Cho YB, Wang K, et al. Patterns of somatic alterations between matched primary and metastatic colorectal tumors characterized by whole-genome sequencing. *Genomics*. 2014;104(4):234-241.
217. Lee SY, Haq F, Kim D, et al. Comparative Genomic Analysis of Primary and Synchronous Metastatic Colorectal Cancers. Wikman H, ed. *PLoS One*. 2014;9(3):e90459.
218. Goranova TE, Ohue M, Shimoharu Y, Kato K. Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clin Exp Metastasis*. 2011;28(5):427-435.
219. Sayagués JM, del Mar Abad M, Melchor HB, et al. Intratumoural cytogenetic heterogeneity of sporadic colorectal carcinomas suggests several pathways to liver metastasis. *J Pathol*. 2010;221(3):308-319.
220. Sayagués JM, Corchete LA, Gutiérrez ML, et al. Genomic characterization of liver metastases from colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2016;7(45):72908-72922.
221. Kim R, Schell MJ, Teer JK, Greenawalt DM, Yang M, Yeatman TJ. Co-evolution of somatic variation in primary and metastatic colorectal cancer may expand biopsy indications in the molecular era. Suzuki H, ed. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126670.
222. Muñoz-Bellvis L, Fontanillo C, González-González M, et al. Unique genetic profile of sporadic colorectal cancer liver metastasis versus primary tumors as defined by high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Mod Pathol*. 2012;25(4):590-601.
223. Cai Z, Han S, Li Z, et al. A genome-wide assessment of variations of primary colorectal cancer maintained in metastases. *Gene*. 2016;595(1):18-24.
224. Knösel T, Petersen S, Schwabe H, et al. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch*. 2002;440(2):187-194.
225. Sayagués JM, Fontanillo C, Abad MDM, et al. Mapping of genetic abnormalities of primary tumours from metastatic CRC by high-resolution SNP arrays. *PLoS One*. 2010;5(10):e13752.
226. Normanno N, Rachiglio AM, Lambiase M, et al. Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015;26(8):1710-1714.
227. Kosmidou V, Oikonomou E, Vlassi M, et al. Tumor Heterogeneity Revealed by KRAS , BRAF , and PIK3CA Pyrosequencing: KRAS and PIK3CA Intratumor Mutation Profile Differences and Their Therapeutic Implications. *Hum Mutat*. 2014;35(3):329-340.
228. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, et al. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol*. 2012;30(24):2956-2962.

229. Li Z-Z, Bai L, Wang F, et al. Comparison of KRAS mutation status between primary tumor and metastasis in Chinese colorectal cancer patients. *Med Oncol.* 2016;33(7):71.
230. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res.* 2010;16(3):790-799.
231. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol.* 2006;41(3):185-192.
232. Zhai Z, Yu X, Yang B, et al. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: Clinical implications, challenges and solutions for treatment resistance. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;64:107-115.
233. Barranha R, Costa JL, Carneiro F, Machado JC. Genetic Heterogeneity in Colorectal Cancer and its Clinical Implications. *Acta Med Port.* 28(3):370-375.
234. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-1356.
235. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015;148(1):77-87.e2.
236. Inamura K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers (Basel).* 2018;10(1).
237. Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis.* 2005;26(5):916-922.
238. Pathak S. Cytogenetics of epithelial malignant lesions. *Cancer.* 1992;70(4 S):1660-1670.
239. Roerink SF, Sasaki N, Lee-Six H, et al. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature.* 2018;556(7702):437-462.
240. Kim TM, Jung SH, An CH, et al. Subclonal genomic architectures of primary and metastatic colorectal cancer based on intratumoral genetic heterogeneity. *Clin Cancer Res.* 2015;21(19):4461-4472.
241. Sylvester BE, Vakiani E. Tumor evolution and intratumor heterogeneity in colorectal carcinoma: Insights from comparative genomic profiling of primary tumors and matched metastases. *J Gastrointest Oncol.* 2015;6(6):668-675.
242. Muñoz-Bellvis L, Fontanillo C, González-González M, et al. Unique genetic profile of sporadic colorectal cancer liver metastasis versus primary tumors as defined by high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Mod Pathol.* 2012;25(4):590-601.

243. Blanco-Calvo M, Concha Á, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal cancer classification and cell heterogeneity: A systems oncology approach. *Int J Mol Sci*. 2015;16(6):13610-13632.
244. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(11):863-875.
245. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol*. 2009;27(11):1814-1821.
246. Giannakis M, Mu J, Shukla SA, et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma Article Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *CellReports*. 2016;15:857-865.
247. McGill G, Fisher DE. p53 and cancer therapy: a double-edged sword. *J Clin Invest*. 1999;104(3):223-225.
248. Licitra L, Störkel S, Kerr KM, et al. Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1161-1168.
249. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2005;23(9):1803-1810.
250. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. *K-ras* Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1757-1765.
251. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:1408-1417.
252. 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(10):1626-1634.
253. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(11):1023-1034.
254. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2017;35(13):1453-1486.
255. Bartley AN, Hamilton SR, Ambinder EP, et al. Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Colon and Rectum.

256. Kelley RK, Wang G, Venook AP. Biomarker use in colorectal cancer therapy. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011;9(11):1293-1302.
257. LeGolvan MP, Taliano RJ, Resnick MB. Application of molecular techniques in the diagnosis, prognosis and management of patients with colorectal cancer: a practical approach. *Hum Pathol*. 2012;43(8):1157-1168.
258. de Gramont A, de Gramont A, Chibaudel B, et al. From chemotherapy to targeted therapy in adjuvant treatment for stage III colon cancer. *Semin Oncol*. 2011;38(4):521-532.
259. Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Van Cutsem E. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol*. 2012;30(29):3570-3577.
260. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA*. 2010;304(16):1812-1820.
261. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2015;51(5):587-594.
262. 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(35):5705-5712.
263. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1888-1894.
264. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. 2012;48(10):1466-1475.
265. García-Alfonso P, Salazar R, García-Foncillas J, et al. 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):726-739.
266. Hong DS, Morris VK, El Osta B, et al. Phase IB study of vemurafenib in combination with irinotecan and cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer with BRAFV600E mutation. *Cancer Discov*. 2016;6(12):1352-1365.
267. Corcoran RB, Andre T, Atreya CE, et al. Research article combined BRAF, EGFR, and MEK inhibition in patients with BRAFV600E-mutant colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2018;8(4):428-443.
268. Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M, et al. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia*. 2008;10(6):534-541.

269. Abubaker J, Bavi P, Al-Harbi S, et al. Clinicopathological analysis of colorectal cancers with PIK3CA mutations in Middle Eastern population. *Oncogene*. 2008;27(25):3539-3545.
270. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, et al. PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer Are Associated with Clinical Resistance to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies. *Cancer Res*. 2009;69(5):1851-1857.
271. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, et al. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(9):3184-3188.
272. Mao C, Yang ZY, Hu XF, Chen Q, Tang JL. PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2012;23(6):1518-1525.
273. Roock W De, Vriendt V De, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: Implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011;12(6):594-603.
274. Domingo E, Church DN, Sieber O, et al. Evaluation of PIK3CA mutation as a predictor of benefit from nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4297-4305.
275. Han C-B, Jie-Tao M, Fan L, Hua-Wei Z. Molecular Markers for the Prediction of Anti-EGFR Monoclonal Antibody Treatment Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer. *J Cancer Ther*. 2011;2(5):675-682.
276. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer*. 2000;88(7):1739-1757.
277. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(4):337-345.
278. Isaksson-Mettävainio M, Palmqvist R, Forssell J, Stenling R, Oberg A. SMAD4/DPC4 expression and prognosis in human colorectal cancer. *Anticancer Res*. 26(1B):507-510.
279. Tascilar M, Offerhaus GJA, Altink R, et al. Immunohistochemical Labeling for the Dpc4 Gene Product Is a Specific Marker for Adenocarcinoma in Biopsy Specimens of the Pancreas and Bile Duct. *Am J Clin Pathol*. 2001;116(6):831-837.
280. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*. 2002;20(4):1043-1048.
281. Ward RL, Turner J, Williams R, et al. Routine testing for mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer is justified. *J Pathol*. 2005;207(4):377-384.

282. Eberhard J, Gaber A, Wangefjord S, et al. A cohort study of the prognostic and treatment predictive value of SATB2 expression in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(5):931-938.
283. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science (80-)*. 1989;244(4901):217-221.
284. Swanton C. Intratumor heterogeneity: Evolution through space and time. *Cancer Res*. 2012;72(19):4875-4882.
285. Golubnitschaja O, Sridhar KC. Liver metastatic disease: new concepts and biomarker panels to improve individual outcomes. *Clin Exp Metastasis*. 2016;33(8):743-755.
286. Rasillo A, Taberero MD, Sánchez ML, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidization patterns in monoclonal gammopathy of undetermined significance versus multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cancer*. 2003;97(3):601-609.
287. Sayagués JM, Taberero MD, Maíllo A, et al. Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): Is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? *J Mol Diagnostics*. 2004;6(4):316-325.
288. Xueying Mao, Bryan D. Young, Yong-Jie Lu. The Application of Single Nucleotide Polymorphism Microarrays in Cancer Research. *Curr Genomics*. 2007;8(4):219-228.
289. LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: A decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(13):4181-4193.
290. Das K, Tan P. Molecular cytogenetics: Recent developments and applications in cancer. *Clin Genet*. 2013;84(4):315-325.
291. Serrati S, de Summa S, Pilato B, et al. Next-generation sequencing: Advances and applications in cancer diagnosis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:7355-7365.
292. Malapelle U, Pisapia P, Sgariglia R, et al. Less frequently mutated genes in colorectal cancer: Evidences from next-generation sequencing of 653 routine cases. *J Clin Pathol*. 2016;69(9):767-771.
293. Tops BBJ, Normanno N, Kurth H, et al. Development of a semi-conductor sequencing-based panel for genotyping of colon and lung cancer by the Onconetwork consortium. *BMC Cancer*. 2015;15(1).
294. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002;418(6901):934.
295. Obuch JC, Ahnen DJ. Colorectal Cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2016;45(3):459-476.

296. González-González M, Muñoz-Bellvis L, Mackintosh C, et al. Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as Assessed by Interphase FISH in Sporadic Colorectal Carcinomas. Ashktorab H, ed. *PLoS One*. 2012;7(8):e42683.
297. Eklöf V, Wikberg ML, Edin S, et al. The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013;108(10):2153-2163.
298. Rui Y, Wang C, Zhou Z, Zhong X, Yu Y. K-Ras mutation and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology*. 62(137):19-24.
299. Chang Y-Y, Lin J-K, Lin T-C, et al. Impact of KRAS mutation on outcome of patients with metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2014;61(135):1946-1953.
300. Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, et al. Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol*. 2001;27(1):80-87.
301. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, et al. Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2008;99(1):83-89.
302. Liou J-M, Wu M-S, Shun C-T, et al. Mutations in BRAF correlate with poor survival of colorectal cancers in Chinese population. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(11):1387-1395.
303. Shaukat A, Arain M, Thaygarajan B, Bond JH, Sawhney M. Is BRAF Mutation Associated with Interval Colorectal Cancers? *Dig Dis Sci*. 2010;55(8):2352-2356.
304. Yu J, Wu WKK, Li X, et al. Novel recurrently mutated genes and a prognostic mutation signature in colorectal cancer. *Gut*. 2015;64(4):636-645.
305. Deschoolmeester V, Boeckx C, Baay M, et al. KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *Br J Cancer*. 2010;103(10):1627-1636.
306. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, et al. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(11):2569-2575.
307. Dallol A, Buhmeida A, Al-Ahwal MS, et al. Clinical significance of frequent somatic mutations detected by high-throughput targeted sequencing in archived colorectal cancer samples. *J Transl Med*. 2016;14(1):118.
308. Aldiab A, Al Khayal KA, Al Obaid OA, et al. Clinicopathological Features and Predictive Factors for Colorectal Cancer Outcome in the Kingdom of Saudi Arabia. *Oncology*. 2017;92(2):75-86.
309. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(16):2622-2629.

310. Palomba G, Doneddu V, Cossu A, et al. Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study. *J Transl Med.* 2016;14(1):292.
311. Foltran L, De Maglio G, Pella N, et al. Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer. *Future Oncol.* 2015;11(4):629-640.
312. Kawabata Y, Tomita N, Monden T, et al. Molecular characteristics of poorly differentiated adenocarcinoma and signet-ring-cell carcinoma of colorectum. *Int J cancer.* 1999;84(1):33-38.
313. Summers MG, Smith CG, Maughan TS, Kaplan R, Escott-Price V, Cheadle JP. *BRAF* and *NRAS* Locus-Specific Variants Have Different Outcomes on Survival to Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(11):2742-2749.
314. Li Z-Z, Wang F, Zhang Z-C, et al. Mutation profiling in chinese patients with metastatic colorectal cancer and its correlation with clinicopathological features and anti-EGFR treatment response. *Oncotarget.* 2016;7(19):28356-28368.
315. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2015;136(1):83-90.
316. Irahara N, Baba Y, Nosho K, et al. NRAS Mutations Are Rare in Colorectal Cancer. *Diagnostic Mol Pathol.* 2010;19(3):157-163.
317. Olevian DC, Nikiforova MN, Chiosea S, et al. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. *Hum Pathol.* 2016;49:124-134.
318. Yaeger R, Cercek A, Chou JF, et al. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2014;120(15):2316-2324.
319. Nakaji Y, Oki E, Nakanishi R, et al. Prognostic value of BRAF V600E mutation and microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143(1):151-160..
320. Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, et al. Predictive and Prognostic Roles of BRAF Mutation in Stage III Colon Cancer: Results from Intergroup Trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res.* 2012;18(3):890-900.
321. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol.* 2016;27(9):1746-1753.
322. Seligmann JF, Fisher D, Smith CG, et al. Investigating the poor outcomes of BRAF-mutant advanced colorectal cancer: analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017;28(3):562-568.

323. Rosty C, Young JP, Walsh MD, et al. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. *Mod Pathol*. 2013;26(6):825-834.
324. Chang S-C, Lin P-C, Lin J-K, et al. Mutation Spectra of Common Cancer-Associated Genes in Different Phenotypes of Colorectal Carcinoma Without Distant Metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(3):849-855.
325. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, et al. KRAS, p53 and BRAF gene mutations and aneuploidy in sporadic colorectal cancer progression. *Cell Oncol*. 2006;28(4):161-166.
326. Xu Cai Z, Dong Tang X, Li Gao H, et al. *APC, FBXW7, KRAS, PIK3CA, and TP53 Gene Mutations in Human Colorectal Cancer Tumors Frequently Detected by Next-Generation DNA Sequencing*. Vol 8.; 2014.
327. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer*. 2005;92(3):434-444.
328. Tang R, Wang J-Y, Fan C-W, et al. p53 is an independent pre-treatment markers for long-term survival in stage II and III colorectal cancers: an analysis of interaction between genetic markers and fluorouracil-based adjuvant therapy. *Cancer Lett*. 2004;210(1):101-109.
329. González-González M, Muñoz-Bellvis L, Mackintosh C, et al. Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as assessed by interphase FISH in sporadic colorectal carcinomas. *PLoS One*. 2012;7(8):e42683.
330. Zhou Y, Wang H, Gong H, Cao M, Zhang G, Wang Y. Clinical significance of perineural invasion in stages II and III colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2015;211(11):839-844.
331. Das V, Kalita J, Pal M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:8-19.
332. Dienstmann R, Mason MJ, Sinicrope FA, et al. Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: a retrospective, pooled biomarker study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017;28(5):1023-1031.
333. Ålgars A, Sundström J, Lintunen M, et al. *EGFR* gene copy number predicts response to anti-EGFR treatment in *RAS* wild type and *RAS / BRAF / PIK3CA* wild type metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2017;140(4):922-929.
334. Sugai T, Eizuka M, Takahashi Y, et al. Molecular subtypes of colorectal cancers determined by PCR-based analysis. *Cancer Sci*. 2017;108(3):427-434.
335. Nakayama I, Shinozaki E, Matsushima T, et al. Retrospective study of RAS/PIK3CA/BRAF tumor mutations as predictors of response to first-line chemotherapy with bevacizumab in metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2017;17(1):38.

336. Barras D, Missiaglia E, Wirapati P, et al. BRAF V600E Mutant Colorectal Cancer Subtypes Based on Gene Expression. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):104-115.
337. Van Cutsem E, Köhne C-H, 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(15):2011-2019.
338. Shaib W, Mahajan R, El-Rayes B. Markers of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2013;4(3):308-318.
339. Iwasa Y, Michor F. Evolutionary Dynamics of Intratumor Heterogeneity. Belshaw R, ed. *PLoS One.* 2011;6(3):e17866.
340. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell.* 2015;27(1):15-26.
341. Turtoi A, Blomme A, Castronovo V. Intratumoral heterogeneity and consequences for targeted therapies. *Bull Cancer.* 2015;102(1):17-23.
342. Ciardiello F, Normanno N, Maiello E, et al. Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: findings from the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2014;25(9):1756-1761.
343. Brannon AR, Vakiani E, Sylvester BE, et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol.* 2014;15(8):454.
344. Mao C, Wu X-Y, Yang Z-Y, et al. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. *Sci Rep.* 2015;5:8065.
345. Zauber P, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Bishop DT. Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol.* 2003;56(3):137-140.
346. Etienne-Grimaldi M-C, Formento J-L, Francoual M, et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14(15):4830-4835.
347. Albanese I, Scibetta AG, Migliavacca M, et al. Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(3):784-791.
348. Losi L, Benhattar J, Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1992;28A(6-7):1115-1120.
349. 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(31):4706-4713.

350. Knijn N, Mekenkamp LJM, Klomp M, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2011;104(6):1020-1026.
351. Jeantet M, Tougeron D, Tachon G, et al. High Intra- and Inter-Tumoral Heterogeneity of RAS Mutations in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
352. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ETHH, Winter A, Pickford IR, Birnie GD. Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol*. 1998;185(2):130-138.
353. Miranda E, Bianchi P, Destro A, et al. Genetic and epigenetic alterations in primary colorectal cancers and related lymph node and liver metastases. *Cancer*. 2013;119(2):266-276.
354. Wu X, Northcott PA, Dubuc A, et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature*. 2012;482(7386):529-533.
355. Kim T-M, An CH, Rhee J-K, et al. Clonal origins and parallel evolution of regionally synchronous colorectal adenoma and carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(29):27725-27735.
356. Hirsch D, Camps J, Varma S, et al. A new whole genome amplification method for studying clonal evolution patterns in malignant colorectal polyps. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(5):490-500.
357. Løes IM, Immervoll H, Sorbye H, et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA, TP53 status and intraindividual mutation heterogeneity on outcome after liver resection for colorectal cancer metastases. *Int J cancer*. 2016;139(3):647-656.
358. Vrabie CD, Ceaușu M, Petrescu A, Waller M, Dina I. The usefulness of immunohistochemistry in sporadic colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol*. 2008;49(4):525-535.
359. Jansson A, Sun XF. Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *APMIS*. 1997;105(9):730-734.
360. Ahmed NY, Ismail AT, Kareem TS. A clinicopathologic study of Ki-67 proliferation index in colorectal carcinoma. *Saudi Med J*. 2012;33(8):841-845.
361. Valera V, Yokoyama N, Walter B, Okamoto H, Suda T, Hatakeyama K. Clinical significance of Ki-67 proliferation index in disease progression and prognosis of patients with resected colorectal carcinoma. *Br J Surg*. 2005;92(8):1002-1007.
362. Liu B-W, Liu Y, Liu J-R, Feng Z-X, Liu T. Prognostic effect of p53 expression in patients with completely resected colorectal cancer. *Tumor Biol*. 2014;35(10):9893-9896.
363. Nasif WA, Lotfy M, El-Sayed IH, El-Kenawy AE-M, El-Shahat M, El-Hak NG. Implications of CEA and p53 overexpression in the poor prognosis of colorectal cancer. *Med Oncol*. 2006;23(2):237-244.

364. Pyo J-S, Kang G, Park K. Clinicopathological Significance and Diagnostic Accuracy of HER2 Immunohistochemistry in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Int J Biol Markers*. 2016;31(4):389-394.
365. Toon CW, Chou A, Clarkson A, et al. Immunohistochemistry for myc predicts survival in colorectal cancer. Ellis NA, ed. *PLoS One*. 2014;9(2):e87456.
366. Qian L-Y, Li P, Li X-R, Chen D-J, Zhu S-H. Multivariate analysis of molecular indicators for postoperative liver metastasis in colorectal cancer cases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(8):3967-3971.
367. Li N, Wang J, Shen S, Bu X, Tian X, Huang P. Expression of p53, Ki-67 and c-Myc proteins is predictive of the surgical molecular margin in colorectal carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2011;17(3):479-487.
368. Lee KS, Kwak Y, Nam KH, et al. Favorable prognosis in colorectal cancer patients with co-expression of c-MYC and β -catenin. *BMC Cancer*. 2016;16(1):730.
369. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 Patients With Right- and Left-Sided Colon Cancer: Differences in Epidemiology, Perioperative Course, Histology, and Survival. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(1):57-64.
370. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-2087.e3.
371. Kloor M, Staffa L, Ahadova A, von Knebel Doeberitz M. Clinical significance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Langenbeck's Arch Surg*. 2014;399(1):23-31.
372. Alvarado-Bachmann R, Smith A, Gundara JS, et al. The incidence of mismatch repair gene defects in colorectal liver metastases. *Mol Med Rep*. 2014;10(2):1003-1006.
373. Kim CG, Ahn JB, Jung M, et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2016;115(1):25-33.
374. Setaffy L, Langner C. Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance. *Pol J Pathol*. 2015;66(3):203-218.
375. Saridaki Z. Prognostic and predictive significance of MSI in stages II/III colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):6809.
376. Guidoboni M, Gafà R, Viel A, et al. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol*. 2001;159(1):297-304.
377. Michael-Robinson JM, Biemer-Hüttmann A, Purdie DM, et al. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut*. 2001;48(3):360-366.

378. Michael-Robinson JM, Reid LE, Purdie DM, et al. Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(8):2347-2356.
379. Wang JY, Lu CY, Chu KS, et al. Prognostic significance of pre- and postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancer. *Eur Surg Res.* 2007;39(4):245-250.
380. Ordoñez C, Screatton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res.* 2000;60(13):3419-3424.
381. Bajenova O V, Zimmer R, Stolper E, Salisbury-Rowswell J, Nanji A, Thomas P. Heterogeneous RNA-binding protein M4 is a receptor for carcinoembryonic antigen in Kupffer cells. *J Biol Chem.* 2001;276(33):31067-31073.
382. Thomas P, Forse RA, Bajenova O. Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28(8):923-932.
383. Kammerer R, von Kleist S. CEA expression of colorectal adenocarcinomas is correlated with their resistance against LAK-cell lysis. *Int J cancer.* 1994;57(3):341-347.
384. Rego RL, Foster NR, Smyrk TC, et al. Prognostic effect of activated EGFR expression in human colon carcinomas: comparison with EGFR status. *Br J Cancer.* 2010;102(1):165-172.
385. Spano J-P, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2005;16(1):102-108.
386. Goos JACM, Hiemstra AC, Coupé VMH, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) are prognostic biomarkers for patients with resected colorectal cancer liver metastases. *Br J Cancer.* 2014;111(4):749-755.
387. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer.* 2001;92(5):1331-1346.
388. Karameris A, Kanavaros P, Aninos D, et al. Expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63 cases. *Pathol Res Pract.* 1993;189(2):133-137.
389. Radinsky R, Risin S, Fan D, et al. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 1995;1(1):19-31.

390. Du P, Xu B, Zhang D, et al. Hierarchical investigating the predictive value of p53, COX2, EGFR, nm23 in the post-operative patients with colorectal carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(1).
391. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(6):823-835.
392. Tsai W-C, Lin C-K, Lee H-S, et al. Discordance between EGFR expression and clinicopathologic parameters of colorectal adenocarcinoma in Taiwan. *Chin J Physiol*. 2012;55(5):352-360.
393. Hemmings C, Broomfield A, Bean E, Whitehead M, Yip D. Immunohistochemical expression of EGFR in colorectal carcinoma correlates with high but not low level gene amplification, as demonstrated by CISH. *Pathology*. 2009;41(4):356-360.
394. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2005;6:279-286.
395. Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, et al. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2008;19(4):717-723.
396. Shen W-D, Chen H-L, Liu P-F. EGFR gene copy number as a predictive biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer treatment: a meta-analysis. *Chin J Cancer Res*. 2014;26(1):59-71.
397. Khan SA, Zeng Z, Shia J, Paty PB. EGFR Gene Amplification and KRAS Mutation Predict Response to Combination Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2017;23(3):673-677.
398. Niu CS, Yang Y, Cheng C-D. MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression. *Int J Oncol*. 2013;42(5):1533-1540.
399. Zhang X, Wang H, Zhang S, et al. MiR-134 functions as a regulator of cell proliferation, apoptosis, and migration involving lung septation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2012;48(2):131-136.
400. Li J, Wang Y, Luo J, et al. miR-134 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting FOXM1 in non-small cell lung cancer cells. *FEBS Lett*. 2012;586(20):3761-3765.
401. Liu Y, Zhang M, Qian J, et al. miR-134 functions as a tumor suppressor in cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal Transition by targeting KRAS in renal cell carcinoma cells. *DNA Cell Biol*. 2015;34(6):429-436.
402. Qin Q, Wei F, Zhang J, Wang X, Li B. miR-134 inhibits non-small cell lung cancer growth by targeting the epidermal growth factor receptor. *J Cell Mol Med*. 2016;20(10):1974-1983.

403. El-Daly SM, Abba ML, Patil N, Allgayer H. miRs-134 and -370 function as tumor suppressors in colorectal cancer by independently suppressing EGFR and PI3K signalling. *Sci Rep.* 2016;6(1):24720.
404. Bjaanaes MM, Halvorsen AR, Solberg S, et al. Unique microRNA-profiles in EGFR-mutated lung adenocarcinomas. *Int J cancer.* 2014;135(8):1812-1821.