

Departamento de Medicina
Centro de Investigación del Cáncer
Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca

TESIS DOCTORAL

IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES GENOMICOS EN EL CANCER COLORRECTAL ESPORADICO

María González González

2018

Directores:

Prof. José Alberto Orfao

Dr. José María Sayagués

Prof. Manuel Fuentes

Prof. Luís Muñoz Bellvis

Esta Tesis Doctoral fue desarrollada siendo María González González beneficiaria de una “Ayuda contratos PFIS: Contratos Predoctorales de Formación en Investigación en Salud” financiada por el Instituto de Salud Carlos III (FI08/00721).

Para el desarrollo de la misma contó también con el apoyo (financiación por proyectos, utilización de infraestructuras y/o cesión de muestras) de las siguientes instituciones:

- Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (PI12/02053/FIS) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).
 - Junta Castilla-León (SAN673/SA39/08, SAN103/2011, BIO/SA02/13, GRS104/A/14)
 - Fundación Memoria Samuel Solórzano Barruso
 - Obra Social Caja Burgos
 - Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) del Instituto de Salud Carlos III financiada con Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” (PI12/02053-FIOS y RD06/0020/0035-FEDER).
 - Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca, España).
 - Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca (Salamanca, España).
 - José María Sayagués beneficiario de la ayuda del Instituto de Salud Carlos III (CP05/00321)
-

La presente tesis doctoral incluye 3 trabajos originales publicados en revistas indexadas en el *Science Citation Reports*, los cuales se detallan a continuación:

1. Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as assessed by interphase FISH in sporadic colorectal carcinomas.

María González-González¹, Luis Muñoz-Bellvis², Carlos Mackintosh³, Celia Fontanillo⁴, M. Laura Gutiérrez¹, M. Mar Abad⁵, Oscar Bengoechea⁵, Cristina Teodosio¹, Emilio Fonseca⁶, Manuel Fuentes¹, Javier De Las Rivas⁴, Alberto Orfao^{1*}, José María Sayagués^{1*}

PLoS One. 2012;7(8):e42683. doi: 10.1371/journal.pone.0042683.

2. Identification of a characteristic copy number alteration profile by high-resolution single nucleotide polymorphism arrays associated with metastatic sporadic colorectal cancer.

María González-González¹, Celia Fontanillo^{4,7}, María Mar Abad⁵, María Laura Gutiérrez¹, Inés Mota¹, Oscar Bengoechea⁵, Ángel Santos-Briz⁵, Oscar Blanco⁵, Emilio Fonseca⁶, Juana Ciudad¹, Manuel Fuentes¹, Javier De Las Rivas⁴, José Antonio Alcázar², Jacinto García², Luis Muñoz-Bellvis², Alberto Orfao^{1*} y Jose María Sayagues^{1*}

Cancer. 2014 Jul 1;120(13):1948-59. doi: 10.1002/cncr.28681

3. Association between the cytogenetic profile of tumor cells and response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer

María González-González¹, Jacinto García², José Antonio Alcazar², María Laura Gutiérrez¹, Luis Miguel González², Oscar Bengoechea⁵, María Mar Abad⁵, Ángel Santos-Briz⁵, Oscar Blanco⁵, Manuela Martín⁸, Ana Rodríguez⁹, Manuel Fuentes¹, Luis Muñoz-Bellvis², Alberto Orfao^{1*} y José M. Sayagues^{1*}.

Medicine (Baltimore). 2014 Nov;93(26):e153. doi: 10.1097/MD.000000000000153.

¹Servicio General de Citometría-NUCLEUS, Departamento de Medicina y Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Universidad de Salamanca, ²Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática, Departamento de Cirugía, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, ³Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca, ⁴Grupo de Investigación en Bioinformática y Genómica Funcional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca, ⁵Departamento de Patología, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, ⁶Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, ⁷Celgene Institute for Translational Research Europe (CITRE), ⁸Servicio de Radio-diagnóstico, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, ⁹Departamento de Oncología Radioterápica, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

D. José Alberto Orfao, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. María González González y titulado **“Identificación de biomarcadores genómicos en el cáncer colorrectal esporádico”**, reúne las condiciones de originalidad y calidad científicas requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 19 de Julio del año 2018.

Fdo. D. José Alberto Orfao



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

D. José María Sayagués Doctor en Medicina y Cirugía e investigador del Sistema Nacional de Salud

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. María González González y titulado “Identificación de biomarcadores genómicos en el cáncer colorrectal esporádico”, reúne las condiciones de originalidad y calidad científicas requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 19 de Julio del año 2018.

Fdo. José María Sayagués



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

D. Manuel Fuentes, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular y Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. María González González y titulado "Identificación de biomarcadores genómicos en el cáncer colorrectal esporádico", reúne las condiciones de originalidad y calidad científicas requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 19 de Julio del año 2018.

Fdo. D Manuel Fuentes



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

D. Luis Muñoz, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. María González González y titulado **“Identificación de biomarcadores genómicos en el cáncer colorrectal esporádico”**, reúne las condiciones de originalidad y calidad científicas requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 19 de Julio del año 2018.

Fdo. D Luis Muñoz Bellvis

“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante.”

Miguel de Unamuno

“La mejor lección es siempre el buen ejemplo.”

José Saramago

INDICE GENERAL

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

INTRODUCCION	1
1. CARCINOMA COLORRECTAL	1
1.1. Diagnóstico del cáncer colorrectal	4
1.1.1. Pruebas de laboratorio.....	4
1.1.2. Diagnóstico de imagen.....	5
1.1.3. Diagnóstico histopatológico	6
1.1.4. Biopsia líquida.....	6
1.2. Clasificación y estratificación pronóstica de la enfermedad.....	8
1.2.1. Clasificación TNM.....	8
1.2.2. Clasificación histológica	9
1.2.3. Factores pronósticos	11
1.3. Tratamiento del CCR.....	12
1.3.1. Tratamiento quirúrgico	13
1.3.2. Tratamiento farmacológico.....	13
1.3.3. Tratamiento del adenocarcinoma de recto no metastásico	17
2. SUBTIPOS GENÉTICOS DE CARCINOMA COLORRECTAL	19
2.1. CCR hereditario	19
2.2. CCR esporádico.....	21
2.2.1. Alteraciones genéticas primarias.....	22
2.2.2. Alteraciones genéticas secundarias.....	26
2.2.3. Mecanismos de inestabilidad genómica y vías de señalización involucradas en el CCR esporádico	29
2.2.3.1. Mecanismos moleculares involucrados en la inestabilidad genómica del CCR esporádico.....	29
2.2.3.2. Vías de señalización celular asociadas al CRC esporádico.....	33
2.2.4. Heterogeneidad genética del CCR a nivel intra-tumoral.....	43
2.2.5. Genética del CCR metastásico	45
2.2.5.1. Alteraciones genéticas involucradas en el proceso metastásico.....	45

2.2.5.2. Mecanismos moleculares involucrados en el proceso metastásico	49
2.2.6. Técnicas de análisis genómico	56
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	61
MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS	67
ARTÍCULO 1.....	69
ARTÍCULO 2.....	83
ARTICULO 3.....	101
DISCUSIÓN.....	115
CONCLUSIONES	133

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

- **ADN:** ácido desoxirribonucléico
- **ADNtc:** fragmentos de ADN
- **ADRM1:** molécula de adhesión reguladora tipo 1
- **AINES:** antiinflamatorios no esteroideos
- **AJCC:** *International American Joint Committee on Cancer*
- **AKT:** quinasa serina/treonina AKT
- **ANGPT2:** angiopoyetina tipo 2
- **APC:** *Adenomatous Poluposis Coli*
- **ARAF:** serina/treonina quinasa α -RAF
- **ATM:** serina/treonina quinasa ataxia telangiectasia mutado
- **ATR:** serina/treonina quinasa ataxia telangiectasia mutado y Rad
- **AURKA:** aurora quinasa A

B

- **BCL2:** abreviado del inglés *B-cell lymphoma 2*
- **BCL2L1:** regulador de la apoptosis de la familia BCL2
- **BER:** reparación escisión de bases
- **BRAF:** proto-oncogen B-Raf
- **BRCA:** gen del cáncer de mama (abreviado del inglés *breast cancer*)

C

- **C20orf20:** marco de lectura abierto número 20 del cromosoma 24
- **C20orf24:** marco de lectura abierto número 24 del cromosoma 24
- **CACNA1G:** canal de calcio voltaje dependiente tipo subunidad alfa 1G
- **CAF:** fibroblastos asociados a cáncer
- **CC:** citogenética convencional
- **CCNE1:** ciclina E1

- **CCR:** cáncer colorrectal
- **CD44:** proteoglicano condroitín sulfato tipo 8
- **CDK8:** quinasa dependiente de ciclina tipo 8
- **CDKN:** inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
- **CEA:** antígeno carcinoembrionario
- **CEACAM7:** molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario tipo 7
- **CGH:** hibridación genómica comparada
- **CIMP:** fenotipo metilador de las islas CpG (abreviado del inglés *CpG island methylator phenotype*)
- **CIN:** inestabilidad cromosómica
- **C-MYC:** proto-oncogen C-Myc, factor de transcripción BHLH
- **COX:** ciclooxigenasa
- **CRABP1:** proteína de unión de ácido retinoico celular tipo 1
- **CTC:** células tumorales circulantes
- **CTNNB1:** catenina beta tipo 1
- **CXCL1:** quimiocina tipo CXC ligando 1
- **CXCL13:** quimiocina tipo CXC ligando 13

D

- **DCC:** abreviado del inglés *Deleted in Colorectal Cancer*
- **DSBR:** reparación de rupturas en la doble hélice del ADN (abreviado de inglés *double strand break repair*)

E

- **EGFR:** factor de crecimiento epitelial
- **EMT:** transición epitelio mesénquima
- **EpCAM:** molécula de adhesión de célula epitelial (abreviado del inglés *epithelial cell adhesion molecule*)
- **ERBB2:** receptor tirosina quinasa Erb-B2 tipo 2
- **ERK:** proteína quinasa activadora de mitógeno (abreviado del inglés *extracellular signal-related kinase 1*)

F

- **FOXC:** factor de transcripción familia Forkhead (abreviado del inglés *forkhead box protein C1*)

G

- **Gli:** oncogén asociado a glioma
- **GPC:** glipicano
- **GTPasa:** guanosín trifosfatasa

H

- **HES1:** factor de transcripción Hes de la familia BHLH tipo 1
- **HIC1:** proteína hipermetilada en cáncer tipo 1 (abreviado del inglés *hypermethylated in cancer 1*)
- **HIF1:** factor inducible por hipoxia tipo 1
- **HMGA2:** proteína de alta movilidad cromosómica tipo 2 (abreviado del inglés *high mobility group AT-hook 2*)

I

- **ICAM1:** molécula de adhesión intracelular tipo 1
- **ID1:** inhibidor de diferenciación tipo 1
- **IDO:** indoleamina 2,3-dioxigenasa
- **I/FISH:** hibridación in situ fluorescente
- **IGF:** factores de crecimiento tipo insulina
- **IGFBP:** proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina
- **IHC:** inmunohistoquímica
- **IL:** interleucina
- **IRS2:** receptor de factores de crecimiento tipo insulina

L

- **LKB1:** quinasa serina/treonina tipo 11
- **LOH:** pérdida de heterocigosidad (abreviado del inglés *loss of heterozygosity*)

M

- **MALT:** tejido linfoide asociado a mucosas
- **MAPK:** proteína quinasa activadora de mitógeno
- **MEK:** quinasa activadora ERK
- **MET:** transición mesénquima epitelio
- **MINT1:** precursor de la proteína de unión amiloide beta
- **miRNA:** micro RNA
- **MLH1:** gen Homólogo de MutL tipo 1
- **MMP:** metaloproteasas
- **MMR:** sistema de reparación de apareamientos erróneos (abreviado del inglés *mismatch repair*)
- **MSH2:** gen Homólogo de MutS tipo 2
- **MSH6:** gen Homólogo de MutS tipo 6
- **MSI:** inestabilidad de microsatélites

- **MTUS1:** proteína estructural asociada a microtúbulos tipo 1

N

- **NCCN:** *National Comprehensive Cancer Network*
- **NER:** sistema de reparación escisión de nucleótidos
- **NEUROG1:** neurogenina tipo 1
- **NF-κB:** factor nuclear kappa beta
- **NGS:** secuenciación masiva de nueva generación
- **NK:** abreviado del inglés *natural killer*
- **NO:** óxido nítrico
- **NOS:** óxido nítrico sintasa
- **NRAS:** gen de neuroblastoma RAS
- **NTS:** neurotensin

O

- **OMS:** *Organización Mundial de la Salud*

P

- **p16:** quinasa inhibidora dependiente de ciclina tipo 2A
- **PAI1:** proteína de la familia serpina miembro 1
- **PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas
- **PDL1:** ligando de muerte programada tipo 1
- **PIK:** quinasa fosfatidil inositol
- **PIK3CA:** quinasa fosfatidil-4,5-bifostato 3- subunidad catalítica alfa
- **PIP:** fosfatidil inositol
- **PLK1:** serina/treonina quinasa tipo 13
- **PPP2CB:** serina/treonina fosfatasa tipo 2A con subunidad catalítica beta
- **PSM1:** genes de segregación post-meiótico

- **PTCH1:** abreviado del inglés *patched 1*
- **PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (abreviado del inglés *phosphatase and tensin homolog*)

R

- **RASSF9:** miembro de la familia Ras tipo 9
- **RMN:** resonancia magnética nuclear
- **RNA:** ácido ribonucleico
- **RNAtc:** fragmentos de ARN
- **RNPC1:** proteína de unión a RNA tipo 38
- **RQT:** radio-quimioterapia
- **RUNX3:** factor de transcripción Runt tipo 3

S

- **sCRC:** cáncer colorrectal esporádico
- **SG:** supervivencia global
- **SHH:** abreviado del inglés *sonic hedgehog homolog*
- **SLE:** supervivencia libre de enfermedad
- **Slug:** represor de la transcripción de la familia Snail tipo 2
- **SMAD:** abreviado del inglés *mothers against decantaplegic*
- **Smo:** receptor Smoothened de la familia Frizzled
- **SNAIL1:** factor de transcripción represor Snail tipo 1
- **SNP:** polimorfismo de nucleótido único
- **SOCS1:** citocina de señalización supresora tipo 1 (abreviado del inglés *suppressor of cytokine signaling 1*)
- **SP:** sangre periférica
- **STAT3:** señalizador de la traducción y activador de la transcripción tipo 3

T

- **TAC:** tomografía computerizada
- **TGF-1:** factor de crecimiento beta tipo 1
- **TGFBR2:** receptor tipo 2 del factor de crecimiento transformante beta
- **TGF- β :** factor de crecimiento transformante beta
- **TH1L:** trihidrofobina tipo 1
- **TIMP-1:** inhibidor de metaloproteasas tipo 1
- **TNF- α :** factor de necrosis tumoral alfa
- **TP53:** preteína tumoral P53
- **Treg:** linfocitos T reguladores
- **TWIST1:** factor de transcripción Twist de la familia BHLH tipo 1

U

- **uPA:** urokinasa
- **uPAR:** receptor de uroquinasa

V

- **VCAM1:** molécula de adhesión vascular tipo 1
- **VEGF:** factor de crecimiento vasculo-endotelial
- **VEGFR:** Receptor del factor de crecimiento vasculo-endotelial
- **VIM:** vimentin

W

- **WNT2:** proteína WNT tipo 2

Z

- **ZEB:** factor de transcripción tipo dedos de zinc E-box

OTROS

- **5-FU:** 5-fluoruracilo

INTRODUCCIÓN

1. CARCINOMA COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) representa la tercera causa de muerte, en hombres y en mujeres, en el mundo occidental¹, siendo su prevalencia de 40,7 casos por cada 100.000 habitantes y año; para 2017 estimaron una incidencia y mortalidad de 136.830 y 50.310 nuevos casos en Estados Unidos. En la mayoría 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)¹. La principal complicación del CCR es la aparición de metástasis a distancia, que desencadenan la progresión con frecuencia incontrolable de la enfermedad. Aproximadamente, 25% de los pacientes presentan metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (metástasis sincrónicas), siendo el hígado el órgano más frecuentemente colonizado por las células tumorales (50% de los casos), seguido del pulmón (10%)²⁻⁴. Los pacientes con metástasis sincrónicas tienen peor pronóstico, con una esperanza de vida que oscila entre los 6 y los 12 meses si no reciben tratamiento complementario³; además, alrededor de una tercera parte de los casos que no presentan enfermedad metastásica al diagnóstico, progresará con la aparición de metástasis metacrónicas, generalmente en los dos primeros años de evolución de la enfermedad, por ello la realización de un seguimiento estrecho de estos pacientes durante este periodo es crítico para poder llevar a cabo un abordaje terapéutico adecuado de los mismos^{3,4}.

El colon proximal constituye la localización más frecuente (42% de los casos) del tumor primario, seguida del recto (28%)^{1,5,6}. La localización de las metástasis hepáticas es independiente de la localización del tumor primario y suelen manifestarse en forma de nódulos múltiples en los lóbulos hepáticos que infiltran de forma difusa. Con menor frecuencia aparecen metástasis aisladas o una infiltración masiva del hígado.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los principales factores de riesgo para el desarrollo del CCR son la dieta hipercalórica, el consumo excesivo de alcohol y tabaco y un estilo de vida sedentario¹. En este sentido, la adopción de una alimentación rica en vegetales y fibra, y el aumento de la actividad física, se han relacionado con un efecto preventivo de la enfermedad; además, el consumo de algunos fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se ha asociado a un menor riesgo de desarrollar CCR. No obstante lo anterior, la edad constituye uno de los factores de riesgo más importantes,

aumentando significativamente el riesgo de padecer CCR a partir de los 50 años. Por otra parte, constituyen también factores de riesgo para desarrollar CCR, las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, entidades que llegan a considerarse como enfermedades pre-neoplásicas. Finalmente, hoy se conoce la existencia también de una predisposición genética al observarse un riesgo incrementado de padecer CCR entre aquellos sujetos que pertenecen a familias en las que existen individuos afectados por síndromes hereditarios directamente asociados con el desarrollo de CCR, y los que posean algún familiar que haya padecido CCR.

1.1. Diagnóstico del cáncer colorrectal

Actualmente, para el diagnóstico adecuado y temprano del CCR se requiere de una combinación de distintos métodos de rastreo diagnóstico y confirmación histológica. Para el rastreo diagnóstico se emplean habitualmente diferentes técnicas no invasivas (pruebas diagnósticas de laboratorio y de imagen), mientras que para la confirmación diagnóstica del tumor se utilizan técnicas invasivas (análisis histopatológico realizados sobre la propia muestra tumoral).

1.1.1. Pruebas de laboratorio

La aproximación diagnóstica más empleada en el rastreo poblacional de CCR se basa en la detección de sangre oculta en heces, como manifestación asociada a la presencia del tumor a nivel de la luz intestinal. Aunque se trata de un test poco específico, constituye una prueba relativamente fácil de implementar y que no requiere del desplazamiento del sujeto a un centro sanitario, de ahí su amplia aceptación en estudios poblacionales en sujetos >50 años. Para la detección de sangre oculta en heces pueden emplearse dos aproximaciones metodológicas diferentes: i) la detección de hemoglobina mediante el análisis de guayaco o ii) empleando técnicas de inmunohistoquímica⁶⁻⁹. 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 inmunohistoquímicas resultan más eficaces, al ser aparentemente más reproducibles y tienen una sensibilidad estable de alrededor del 79% (69%-86%)⁹.

En paralelo, con la detección de sangre oculta en heces, en la actualidad se emplean también marcadores séricos en el rastreo diagnóstico del CCR. De todos ellos, el marcador tumoral por excelencia más utilizado en la práctica clínica para el screening de CCR en un análisis sérico de rutina, es el antígeno carcinoembrionario (CEA)^{6,7}. CEA es una glicoproteína oncofetal sintetizada por las células intestinales, que está directamente relacionada con el desarrollo tumoral. Así, la detección de concentraciones de CEA en el suero superiores a 5ng/mL constituye uno de los marcadores de alerta diagnóstica de la enfermedad¹⁰; no obstante, CEA no es un marcador específico de CCR (puede encontrarse alterado en otro tipo de tumores como el cáncer de páncreas o en enfermedades inflamatorias intestinales⁷ e incluso en individuos sanos fumadores¹¹) y con relativa frecuencia, solo se detectan valores incrementados en suero de CEA cuando la enfermedad se encuentra ya en fases relativamente avanzadas; permaneciendo incluso indetectable en una fracción significativa de pacientes con CCR clínicamente manifiesto. Pese a estas limitaciones, el marcador CEA se emplea tanto para el diagnóstico de la enfermedad como para la monitorización de la misma tras el tratamiento^{7,10,12}.

1.1.2. Diagnóstico 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 sangre oculta en heces y/o niveles séricos de CEA incrementados. Las pruebas de imagen que actualmente se emplean de forma habitual en las fases tempranas del diagnóstico del CCR incluyen: i) la radiografía convencional de abdomen, ii) la resonancia magnética nuclear (RMN), utilizada principalmente para detectar el tumor, evaluar su tamaño y el estadiaje de la enfermedad¹³, permitiendo además identificar la existencia de afectación ganglionar y evaluar el grado de invasión tumoral de tejidos cercanos y del hígado; iii) la tomografía computerizada (TAC), empleada para la identificación de metástasis al contribuir a una mayor precisión diagnóstica^{14, 15}. Finalmente, en aquellos pacientes en los que se ha confirmado la presencia del tumor y este tiene una localización rectal, el empleo de técnicas endoscópicas de ultrasonidos permite alcanzar una mayor precisión en la definición del grado de invasión tumoral de la

pared intestinal¹⁶, aunque, existen limitaciones a la hora de aplicar esta técnica al estudio de lesiones de localización proximal¹⁶.

1.1.3. Diagnóstico histopatológico

El diagnóstico definitivo del CCR requiere del análisis histopatológico del tumor, que permitirá además establecer el abordaje terapéutico adecuado para cada caso. El análisis histopatológico puede realizarse sobre muestras de biopsia obtenidas mediante colonoscopia^{6, 7, 17} o directamente a partir del tumor una vez resecado. Los estudios histopatológicos proporcionan información acerca del tipo histológico y del grado de diferenciación tumoral (bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciado), su patrón de crecimiento (tubular vs. veloso) y el grado de invasión regional (linfático, venoso y/o neural)⁵. Siempre que sea posible, deben realizarse además estudios histopatológico de los nódulos metastásicos que suelen presentar gran homología celular con el tumor primario; en el caso de las metástasis hepáticas habitualmente se observa infiltración tumoral con ausencia de la estructura trabecular sinusoidal hepática, el estroma y la producción de bilis, características del hígado sano y de los tumores hepáticos.

1.1.4. Biopsia líquida

Actualmente, se considera que la biopsia líquida de diferentes fluidos biológicos, podría constituir una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico precoz y el seguimiento de pacientes con CCR¹⁸. La biopsia líquida constituye una prueba mínimamente invasiva que habitualmente se realiza sobre muestras de sangre, con el fin de buscar células tumorales circulantes (CTC), fragmentos de ADN o ARN (ADNtc, RNAtc), proteínas o exosomas procedentes de las células tumorales y que circulan en la sangre periférica (SP) de estos pacientes.

La detección de CTC se ha postulado como una herramienta clave a la hora de predecir la diseminación a distancia del tumor, así como para monitorizar el tratamiento. Sin embargo en el CCR, la cantidad de CTCs presentes en SP (3 CTC en 7,5mL) es inferior a la establecida para otro tipo de tumores como el adenocarcinoma de mama (>5 CTC en 7,5mL)¹⁹ o el de próstata^{20, 21}; esto se cree sería debido a que

el hígado actúa como filtro donde se establecen de forma específica las CTCs procedentes del intestino, disminuyendo su número en la circulación sistémica. Aun así, la detección de CTCs en SP de pacientes con CCR se ha asociado con periodos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y de supervivencia global (SG) significativamente más cortos respecto al de pacientes que no presentan CTCs^{18, 22}. Una de las principales limitaciones que presenta la identificación de CTCs en el CCR es la falta de marcadores específicos de la célula tumoral. En este sentido, en la actualidad se están desarrollando paneles que buscan combinar marcadores involucrados en la transición epitelio mesénquimal (EMT) como VIM, TWIST1, AKT2 y SNAIL1 junto con marcadores epiteliales típicos del CCR, como EpCAM (CD326) y determinadas citoqueratinas, con el fin de aumentar la capacidad de identificar estas células de forma sensible y específica²³.

En paralelo, la identificación del ADNtc ha abierto en los últimos años una nueva vía de diagnóstico y monitorización tumoral en el CCR. Así, diferentes estudios han demostrado que el ADNtc está presente y puede ser extraído de muestras de plasma, suero o de exosomas, obtenidos a partir de la SP del paciente. En este sentido, el ADNtc podría constituir un material de partida viable para la identificación de alteraciones genéticas asociadas al tumor con utilidad en el diagnóstico, la monitorización del tratamiento y la predicción de recaídas de la enfermedad^{24, 25}. Además, el análisis del ADNtc proporciona información en tiempo real sobre el estado mutacional de los genes involucrados en la patogénesis de la enfermedad, tanto en el tumor primario como en las posibles metástasis del mismo^{24, 26}. En los últimos años se han incrementado el número de estudios basados en la detección del ADNtc en muestras de SP de pacientes con CCR, centrados en la identificación del estado mutacional de los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*, genes que están directamente implicados en la elección del tratamiento más adecuado para este tipo de tumor, como veremos posteriormente; en ellos se refiere un elevado grado de especificidad y sensibilidad de esta aproximación metodológica^{18, 27}.

A su vez, los estudios realizados a partir de exosomas presentes en la circulación sanguínea se basan en la identificación de miRNA y proteínas tumorales presentes en los mismos¹⁸. De entre otros marcadores analizados, la sobre-expresión de MiR-19a se ha asociado con una mayor tasa de recurrencias

del CCR²⁸, a la vez que se han definido diferentes perfiles de expresión proteica que podrían estar relacionados con las fases iniciales del proceso de invasión tumoral de tejidos vecinos o a distancia²⁹.

Aunque los resultados obtenidos mediante distintas aproximaciones metodológicas encaminadas al estudio de muestras de biopsia líquida son muy prometedores, éstas aún deben considerarse como resultados preliminares que han de ser validados en series más amplias con carácter multicéntrico¹⁸.

1.2. Clasificación y estratificación pronóstica de la enfermedad

En la actualidad, en el diagnóstico del CCR se utilizan fundamentalmente dos clasificaciones: i) la clasificación TNM, que informa del tamaño del tumor y el grado de invasión local y a distancia del mismo, y ii) la clasificación histológica, que tiene en cuenta el componente celular mayoritario del tumor.

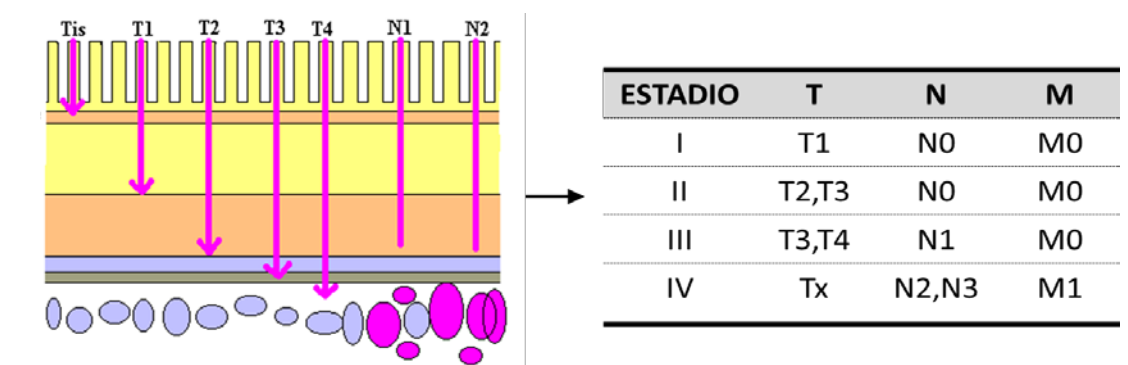
1.2.1. Clasificación TNM

Hoy día el sistema de clasificación internacional TNM se emplea en la práctica clínica para determinar el estadio en el que se encuentra el tumor al diagnóstico⁵. Este sistema de clasificación se basa en la observación de tres parámetros fundamentales: i) el tamaño (T) y grado de invasión local del tumor primario; ii) el grado de afectación ganglionar (N); y iii) la existencia de afectación a distancia (M) (e.j. metástasis a distancia) (Tabla 1). La combinación de estos tres parámetros permite establecer una clasificación por estadios del CCR, tal como se recoge de forma esquemática y tabulada en la Figura 1. En relación a la afectación ganglionar (N), cabe señalar que según el *International American Joint Committee on Cancer* (AJCC) el número mínimo de ganglios que deben analizarse es de 10-13 ganglios linfáticos perirrectales y/o pericólicos; ante un resultado negativo derivado del análisis de un número inferior de ganglios, no sería posible realizar una estratificación diagnóstica fiable del tumor³⁰.

Tabla1: Sistema de clasificación internacional TNM: criterios empleados para definir el tamaño y grado de invasión local del tumor primario (T), el grado de invasión ganglionar (N) y a distancia (M).

T: tumor primario	
Tx	Tumor primario no determinado
T0	No existe evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> intraepitelial o con invasión de la lámina propia
T1	Tumor infiltrante a nivel de submucosa
T2	Tumor infiltrante a nivel de <i>muscularis propria</i>
T3	Tumor infiltrante a nivel de serosa
T4	Tumor perforante (peritoneo, vesical o invasión de órganos adyacentes)
N: afectación ganglionar	
Nx	No se puede determinar
N0	No existe evidencia de metástasis ganglionar
N1	Entre 1 y 3 ganglios linfáticos perirrectales o pericólicos afectados
N2	≥4 ganglios linfáticos perirrectales o pericólicos afectados
M: metástasis a distancia	
Mx	No puede determinarse
M0	No existe evidencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia

Figura 1: Estadios del CCR según la clasificación TNM

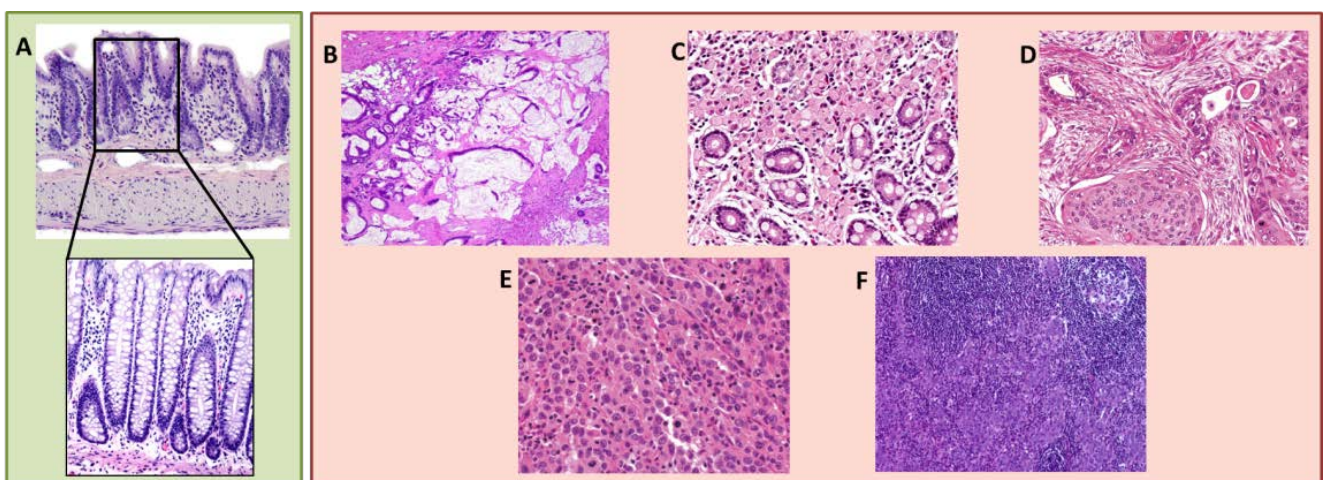


1.2.2. Clasificación histológica

Histológicamente, el adenocarcinomas colorrectal se define como un tumor maligno del tejido epitelial de la mucosa intestinal. De forma característica a nivel tisular, el adenocarcinoma colorrectal muestra alteración de las criptas de Lieberükn, invaginaciones del epitelio que ocupan desde la luz intestinal hasta la mucosa, y que aparecen más alargadas respecto al tejido normal, asociadas a pérdida de la estructura normal de la mucosa. En las células de las zonas tumorales patológicas se detecta una elevada tasa mitótica, asociada con un aumento del tamaño de los núcleos, llegándose a apreciar nucléolos, y una relación núcleo/citoplasmática alterada. Desde el punto de vista histopatológico, la OMS clasifica los

adenocarcinomas colorrectales (Figura 2) en cinco subtipos⁵: i) el adenocarcinoma mucinoso es el subtipo más frecuentes de CCR y se caracteriza por incluir tumores formados en más del 50% por células de Globet productoras de mucina, que puede detectarse también a nivel extracelular en este tipo de tumores; ii) el adenocarcinoma en anillo de sello está compuesto también por más de 50% de sus células de Globet, aunque en esta variedad la mucina sintetizada se encuentra localizada en grandes vacuolas citoplasmáticas llegando a desplazar al núcleo celular y confiriendo a la célula una morfología en anillo de sello típica; iii) el carcinoma adenoescamoso es un subtipo poco frecuente que presenta simultáneamente características de adenocarcinoma y de carcinoma de células escamosas, ya sea entremezcladas entre sí o en diferentes áreas del tumor; iv) el carcinoma medular es también un subtipo histológico poco frecuente de CCR, cuya característica principal es la aparición de células tumorales en láminas con rasgos morfológicos muy bien definidos (núcleo vesicular, nucléolo prominente y gran citoplasma), habitualmente acompañadas de grandes focos de infiltración linfocitaria intraepitelial; y, v) el carcinoma indiferenciado, histológicamente muy variable y que engloba a todos aquellos tumores en los que las células tumorales han perdido las características de diferenciación morfológicas típicas del tejido normal.

Figura 2. Histología del CCR. Fotografías microscópicas que representan el tejido de la mucosa de colon normal y de distintas variantes histopatológicas del CCR tras tinción con hematoxilina/eosina. A: corte histológico de tejido de la mucosa de colon normal; B: adenocarcinoma mucinoso; C: adenocarcinoma en anillo de sello, D: carcinoma adenoescamoso; E: carcinoma medular y F: carcinoma indiferenciado.



1.2.3. Factores pronósticos

Los principales parámetros utilizados en la actualidad para evaluar el pronóstico de pacientes con CCR según la OMS, se recogen a modo de resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales factores pronósticos en el CCR según la OMS (adaptado de la información de la OMS⁵).

	FACTOR PRONÓSTICO	CARACTERÍSTICAS ADVERSAS
Características del tumor	Estadío TNM	T4, N1,2,3 y/o M1
	Tamaño del tumor	Tumor que obstruye la luz intestinal
	Morfología del tumor	Presencia de ulceraciones o perforaciones del tumor
	Patrón histológico	Tumores mucosos
	Perfil de invasión	Presencia de invasión linfática, vascular y neuronal
	Grado de diferenciación	Tumores pobremente diferenciados
Técnica quirúrgica empleada	Tamaño de la pieza resecada	Longitud de la pieza <2-5cm
	Tipo de resección	R1, R2
Marcadores moleculares	CEA	Niveles elevados en suero/plasma
	MSI	MSI-bajo
	<i>BRAF</i>	Mutación V600E
	Enzimas encargadas de digerir la matriz extracelular	↑ Metaloproteasas, uroquinasas
	Moléculas de adhesión	↑ CD44, ICAM-1

↑: sobre-expresión

El grado de invasión del tumor a nivel de la pared intestinal, así como la determinación de la existencia o no de afectación ganglionar y/o de otros tejidos, analizados al diagnóstico para establecer el estadio tumoral en pacientes con CCR, constituye el principal factor pronóstico de la enfermedad. En aquellos casos en los que se detectan metástasis sincrónicas, es importante además establecer las características concretas de estas lesiones, ya que esta información puede aportar valor pronóstico adicional en el CCR^{31, 32}. Así, según un meta-análisis llevado a cabo por Smith *et al*³³ el número de lesiones metastásicas detectadas (≤ 3 vs. ≥ 4) constituye un potente factor pronóstico adicional en pacientes con CCR metastásico³¹, conllevando un número elevado de las mismas una disminución significativa de la SG de los pacientes.

El estudio histológico de los márgenes de resección (tanto del tumor como de sus metástasis) constituye el principal factor pronóstico asociado a la eficacia del tratamiento quirúrgico. En este sentido, podemos diferenciar tres tipos de resección: i) R0, cuando no se observan células tumorales en los márgenes de la pieza resecada; ii) R1, si se aprecian células tumorales en los márgenes; y, iii) R2, cuando tras la resección, macroscópicamente se observa la existencia de tumor residual. La existencia de tumor

residual ya sea micro- o macroscópico (R1 y R2), está directamente relacionada con una mayor tasa de recidivas y con tiempos de SLE y SG significativamente más cortos³¹⁻³⁴.

Además de los parámetros mencionados, el estudio histopatológico del tumor, suele incluir el análisis del patrón de alteración de inestabilidad de microsatélites (MSI), que constituye otro factor pronóstico en el CCR y contribuye a la elección del protocolo de tratamiento adyuvante más adecuado para cada paciente, asociándose un patrón de MSI elevado con un mejor pronóstico, menor tasa de recidivas y mayor SG^{35,36}. A nivel molecular, algunas mutaciones genéticas como las que afectan a los genes *KRAS* y *BRAF*, son importantes también en la actualidad a la hora de seleccionar el tratamiento más adecuado para cada paciente influyendo así en el pronóstico de la enfermedad. Un ejemplo, *BRAF*, una proteína involucrada en la vía de señalización MAP/ERK efectora de EGFR (molécula que su vez actúa como diana de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR empleados en el tratamiento del CCR), asociada con el patrón de MSI (el 60% de los casos que presentan mutación V600E del gen *BRAF* muestran un patrón de MSI elevado, frente solo el 10% en los que este patrón no se observa en pacientes sin dicha mutación)^{37, 38}; así la mutación V600E de *BRAF* detectada en 95% de todos los CCR que presentan mutaciones en este gen (5-15%), está directamente relacionada con la respuesta al tratamiento, constituyendo por sí misma un factor pronóstico adverso al asociarse con a periodos de SLE y SG significativamente más cortos^{39,40}.

Por otra parte, estudios recientes han puesto de manifiesto la posible existencia de una relación entre las células del sistema inmune que infiltran el tumor y el comportamiento clínico y biológico del mismo, sugiriendo que el recuento de algunas de estas poblaciones celulares podría tener valor pronóstico en el CCR, al asociarse un cociente linfocitos-monocitos bajo y , la presencia de un incremento de linfocitos T reguladores (Treg) y la ausencia de linfocitos T “citotóxicos” con un peor pronóstico^{41 42-45}.

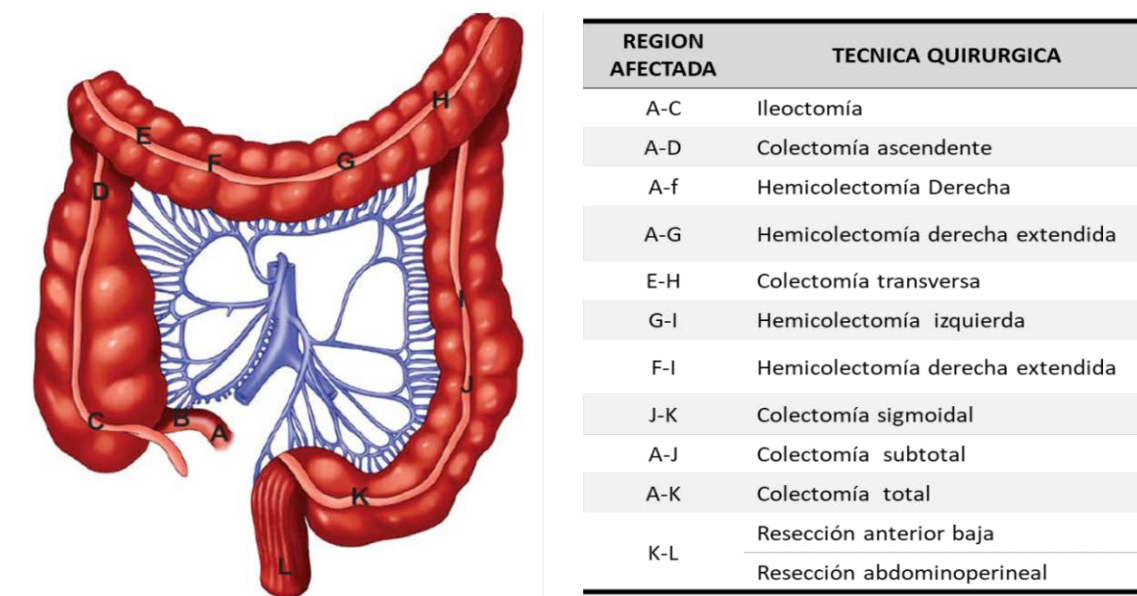
1.3. Tratamiento del CCR

El abordaje terapéutico de los pacientes con CCR requiere una evaluación minuciosa de todas las pruebas diagnósticas realizadas, considerándose la cirugía con fines curativos de forma aislada o combinada con tratamientos farmacológicos complementarios, el tratamiento por excelencia del CCR.

1.3.1. Tratamiento quirúrgico.

El tratamiento quirúrgico busca la resección completa del tumor, dejando los márgenes de resección libres de células tumorales (R0), e incluye también la resección de los ganglios regionales afectados. Las distintas variantes de resección quirúrgica más empleadas en la actualidad, de acuerdo con la localización del tumor primario, se recogen de forma resumida en la Figura 3⁴⁶.

Figura 3: Resección quirúrgica empleada en tumores CCR en función de la localización del tumor (adaptado de NCCN Guideline Colorectal Screening⁴⁶).



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%³¹. No obstante, no todos los pacientes, presenten metástasis o no, son susceptibles de beneficiarse del tratamiento quirúrgico, aplicable únicamente en aquellos sujetos que presenten buenas condiciones quirúrgicas con una expectativa de mortalidad durante la cirugía inferior al 5%, y en las que la resección de los focos metastásicos pueda ser completa (márgenes R0) manteniendo una porción de tejido hepático viable suficiente para la supervivencia del paciente.

1.3.2. Tratamiento farmacológico

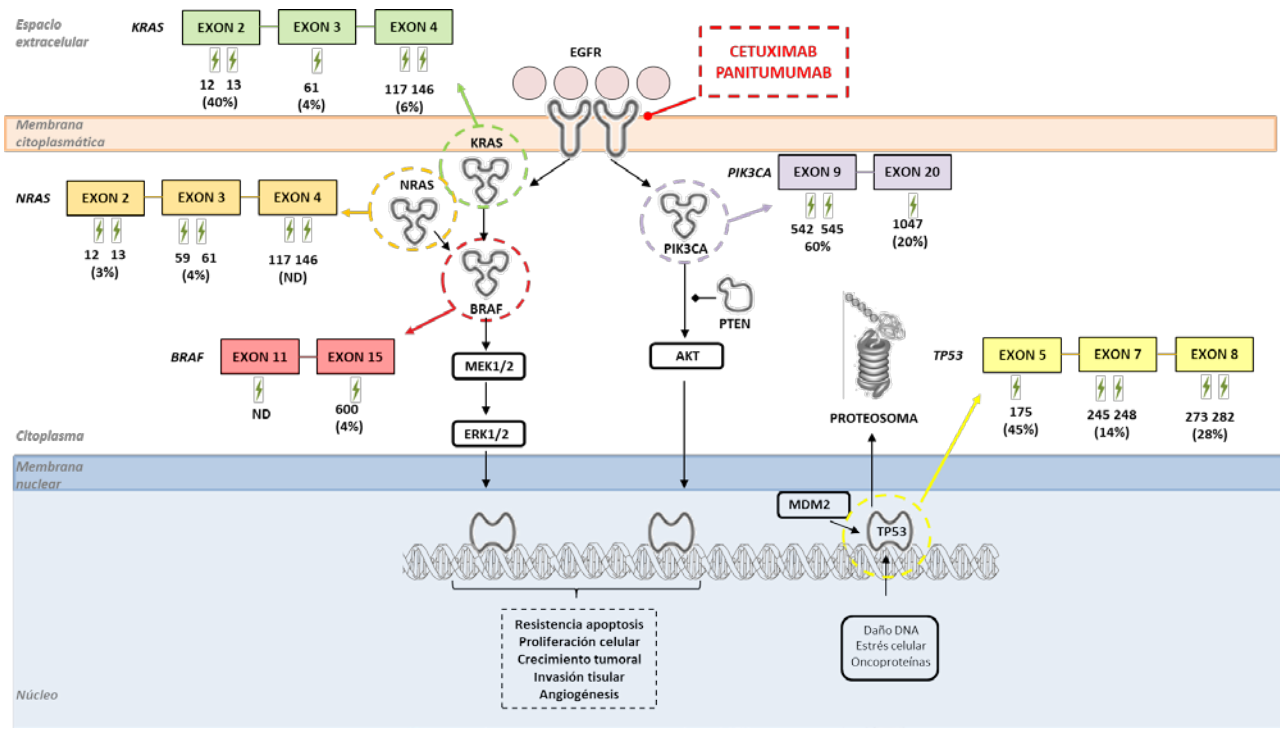
Los primeros protocolos terapéuticos farmacológicos diseñados para pacientes con CCR estaban basados en la administración de agentes quimioterápicos generales; más recientemente, se han

implementado nuevos protocolos que prevén el uso combinado de dichos agentes quimioterápicos con nuevos fármacos como por ejemplo, anticuerpos monoclonales dirigidos frente a dianas oncogénicas específicas. Con los primeros avances, la mediana de SG de los pacientes con enfermedad diseminada que, al iniciar la década de 1980 era de 6 meses, se prolongó hasta el año, al introducirse esquemas basados en el tratamiento con agentes citostáticos como 5-fluoruracilo (5-FU), tegafur, capacetivina, antimetabolitos de fluoropiridinas, y anti-metabolitos derivados de diferentes compuestos esenciales como el ácido fólico y la leucovorina. Posteriormente, la mediana de SG de estos pacientes se alargó hasta los 20 meses con la incorporación del irinotecan (un inhibidor de la topoisomerasa I), y del oxaliplatino (un agente alquilante)⁴⁷⁻⁴⁹. Uno de los factores a tener en cuenta a la hora de administrar alguno de estos fármacos de la familia del 5-FU, es la posible presencia de MSI; así, en aquellos casos que muestran una elevada MSI, y mejor pronóstico, la eficacia de este tipo de fármacos es relativamente limitada, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de establecer el abordaje terapéutico especialmente de pacientes que se encuentran en estadios relativamente poco avanzados de la enfermedad como el estadio II^{35, 38, 50, 51}. Más recientemente, con el mayor conocimiento de las características moleculares del CCR, se han introducido una amplia batería de nuevos fármacos para el tratamiento del CCR, entre los que se incluyen anticuerpos monoclonales como bevacizumab y ramucirumab -anticuerpos anti-receptor tipo 2 del factor de crecimiento vásculo-endotelial (VEGF)-, cetuximab y panitumumab -dos anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR)-, aflibercept (compuesto que bloquea la activación de estos receptores⁵²⁻⁵⁴),^{53, 55} y regarafenib, (inhibidor de proteinquinas)⁵⁶. Estos nuevos fármacos, combinados con los tratamientos citostáticos y quirúrgicos convencionales, mejoran la supervivencia de los pacientes con CCR, especialmente de aquellos que presentan metástasis hepáticas sincrónicas, prolongándose ésta hasta los 24 meses^{48, 49, 57, 58}.

En este sentido, desde 2008 se considera obligatoria la realización del estudio mutacional de un panel de (al menos) 5 genes en el CCR :*KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *BRAF* y *TP53* (Figura 4)^{39, 59, 60} Esto es debido, por ejemplo, a que los fármacos anti-EGFR (cetuximab y panitumumab) sólo son eficaces cuando no existe mutación a nivel de los genes *KRAS* y *NRAS*^{39, 61}. Así, en la guía del NCCN, se recomienda basar la elección del protocolo terapéutico para pacientes con CCR en el análisis del estado mutacional de los codones más

frecuentemente alterados de *KRAS* (codones 12 y 13 del exón 2) y en la detección de la mutación V600E de *BRAF*, alteraciones moleculares que siendo excluyentes entre sí, están asociadas a peor respuesta al tratamiento y un pronóstico más adverso^{48, 49}. Aunque las mutaciones de los exones 3 y 4 de *KRAS* se asocian también a una SLE y una SG significativamente acortadas, no se recomienda su análisis sistemático al ser relativamente poco frecuentes^{39, 40}. No obstante, cabe señalar que se ha evidenciado una eficacia limitada del tratamiento con fármacos anti-EGFR incluso entre casos en los que no se detecta mutación en los genes *NRAS*, *KRAS* y *BRAF*; uno de los posibles mecanismos de resistencia implicados en la peor respuesta al tratamiento observada en estos pacientes, sería la aparición de mutaciones en estos genes, en otras localizaciones menos frecuentes⁴⁰, y/o la existencia de alteraciones en otros genes que intervienen en la vía de señalización EGFR como *PI3K3CA* y *TP53*^{59, 60}. En este sentido, *PI3K3CA* forma parte de la vía de señalización PIK/PIP efectora de EGF, y su gen se encuentra mutado (especialmente en el exón 9) en 10% de los paciente con CCR; estudios recientes muestran que estas alteraciones se asocian con falta de respuesta frente a los tratamiento anti-EGFR en aquellos casos en los que *KRAS* no aparece mutado, asociándose esta resistencia al tratamiento con una SG más corta^{59, 60}. Al contrario de lo que ocurre con el resto de genes analizados, las mutaciones de *TP53* parecen asociarse a diferentes tipos de respuesta dependiendo del tratamiento farmacológico empleado; así, las mutaciones de *TP53* parecen asociarse con altas tasas de respuesta a anticuerpos monoclonales anti-EGFR⁶²⁻⁶⁴, mientras que Iacopetta *et al.* observaron que pacientes de CCR distales con mutación en *TP53*, presentan una elevada tasa de resistencia a los fármacos citostáticos de la familia del 5-FU⁶⁵. En definitiva, los pacientes triples negativos para mutaciones en los genes *KRAS*, *BRAF*, *PI3K3CA* constituirían el subgrupo de CCR que más se beneficiaría de la terapia anti-EGFR⁶².

Figura 4: Representación esquemática de las principales vías de señalización efectoras de EGFR, subrayando aquellas moléculas involucradas en la resistencia a los tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Además, se incluye información sobre las principales mutaciones de estos genes indicando exones, codones y frecuencia de afectación en pacientes con CRC.

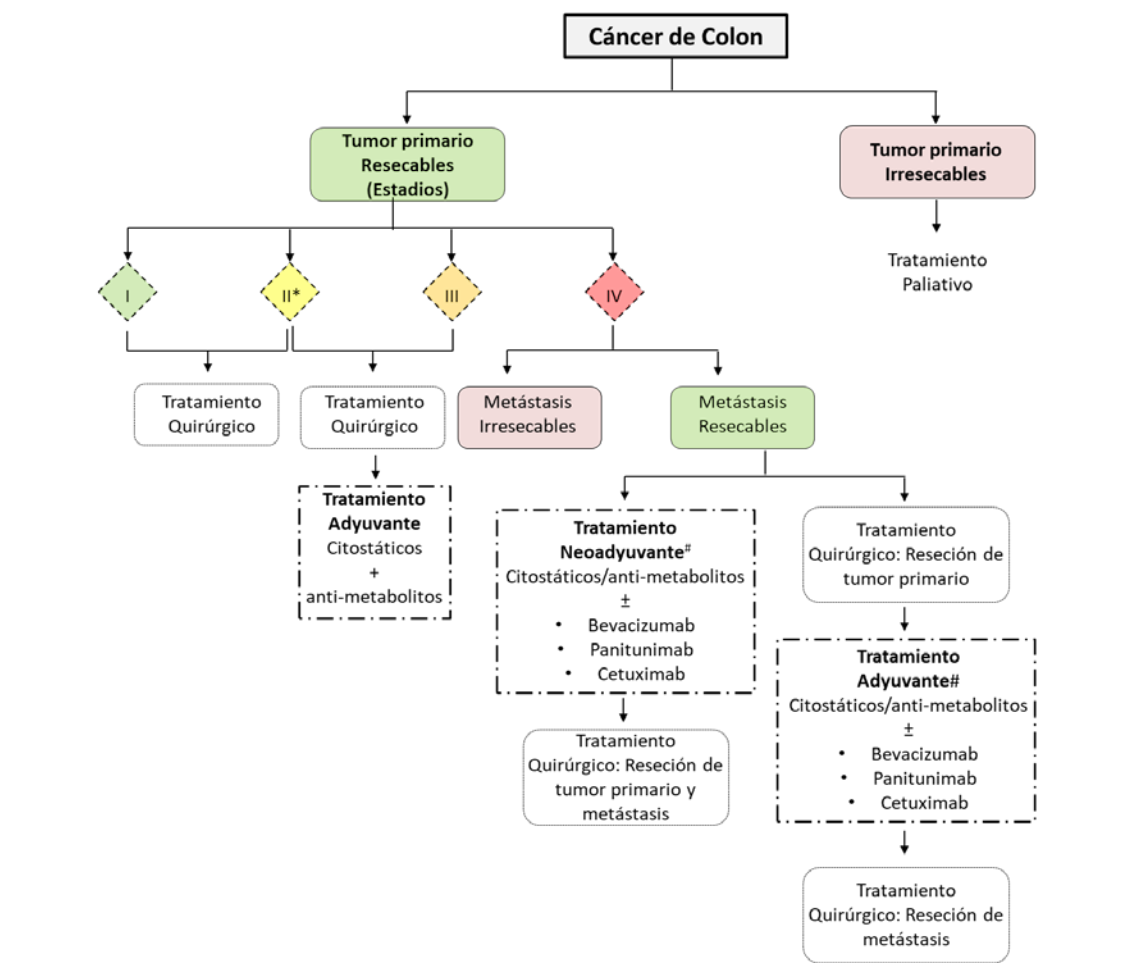


En los últimos años se han introducido también nuevos tratamientos en el CCR. Así, en la actualidad, están en marcha ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales frente a moléculas inhibitoras como anti-PDL1 (nivolumab) que favorecen la activación y respuesta de las células T frente a las células tumorales. Algunos estudios preliminares han relacionado la respuesta frente a estos fármacos con el estado de MSI, de forma que los pacientes con un MSI elevado responden más favorablemente a este tipo de inmunoterapia^{35, 66}.

Dada la gran variedad de tratamientos disponibles y la elevada heterogeneidad tumoral, 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 5 se recogen de forma resumida de (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 5: Algoritmo terapéutico para el cáncer de colon según el estadio al diagnóstico.

*:determinación de MSI, #: determinación del estado mutacional de *KRAS* (codones 12 y 13) y *BRAF* (V600E).



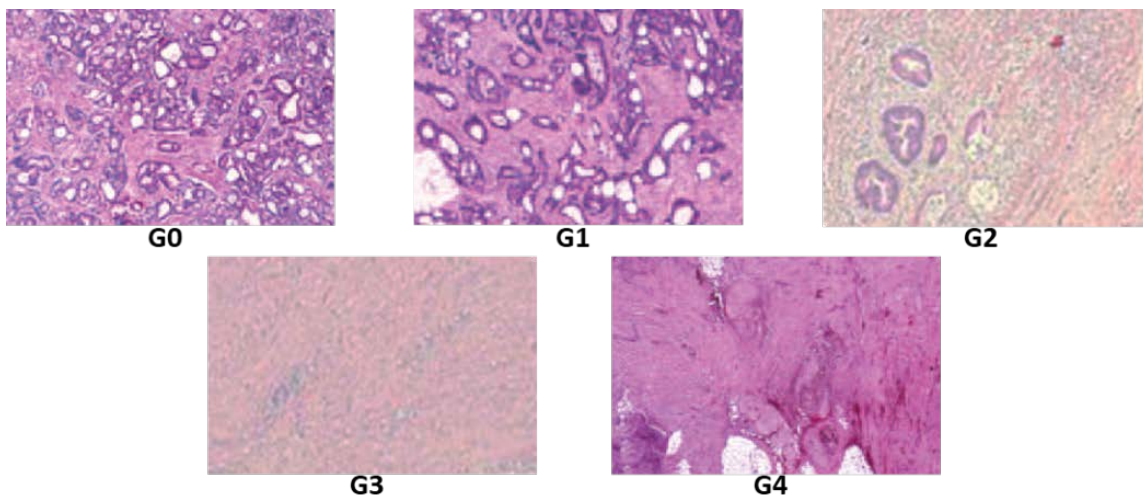
1.3.3. Tratamiento del adenocarcinoma de recto no metastásico

Al igual que ocurre en el adenocarcinoma de colon, la cirugía es esencial para el tratamiento curativo del cáncer de recto. Así, en aquellos casos que se encuentran en los estadios iniciales de la enfermedad (e.j. estadio I) el protocolo terapéutico de elección es la resección quirúrgica completa del tumor (R0). No obstante, en aquellos pacientes que presentan tumores localmente avanzados (estadios II y III), se recomienda que de forma previa a la cirugía, el tumor sea sometido a un tratamiento de radioquimioterapia (RQT)⁴⁹ con el fin de poder realizar una cirugía menos invasiva, que reduzca la tasa de recidivas y permita preservar los esfínteres, contribuyendo con ello mejorar la calidad de vida de los pacientes y a aumentar su SG⁶⁷⁻⁶⁹. La quimioterapia administrada en este contexto incluye los fármacos de

primera línea del tratamiento adyuvante empleados en el adenocarcinoma de colon. Respecto a la radioterapia, merece destacar dos protocolos: i) el protocolo convencional basado en ciclos largos de 1,8 Gy a 45-50,4 Gy; y, ii) la administración de ciclos cortos de 25Gy en una tanda de cinco días⁴⁹.

La evaluación de la respuesta del tumor primario al tratamiento neoadyuvante se realiza sobre la pieza resecada mediante estudio histopatológico post-RQT, siguiendo la escala internacional de Dworak para la evaluación de la misma^{70, 71}. Esta escala tiene en cuenta la disminución del tamaño del tumor, la presencia y/o ausencia de células tumorales en la pieza tratada y los cambios histológicos que se producen como consecuencia de la radioterapia (Figura 6), estableciendo en conjunto 5 grados de respuesta diferentes: G0, ausencia de regresión; G1, predominio de masa tumoral con fibrosis y vasculopatía (nidios tumorales); G2, predominio de cambios fibróticos con grupos de células tumorales (fibrosis); G3, pocas células tumorales en un tejido fibrótico con o sin sustancia mucosa (células tumorales aisladas); y, G4, respuesta completa.

Figura 6: Aspecto histológico del adenocarcinoma rectal tras tratamiento neoadyuvante según la escala internacional de Dworak. Fotografías microscópicas que representan los diferentes grados de respuesta (G0, G1, G2, G3 y G4) en tumores de recto tratados y teñidos con hematoxilina/eosina.



2. SUBTIPOS GENÉTICOS DE CARCINOMA COLORRECTAL

En base a los antecedentes genéticos el CCR se clasifica en dos grandes grupos: CCR hereditario o familiar y CCR esporádico^{5,72}.

2.1. CCR hereditario

Los pacientes que presentan CCR hereditario o con antecedentes familiares, representan entre 10-15% de todos los CCR de nuevo diagnóstico⁵. En esta categoría se engloban diferentes síndromes, cada uno de ellos asociado con distintas alteraciones/mutaciones genéticas germinales de tipo autosómicas que conllevan una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad⁷³. En conjunto, estos síndromes se clasifican en cuatro grandes grupos^{5,74,75}:

- A. CCR hereditario no polipósico (CCHNP) o Síndrome de Lynch. El Síndrome de Lynch corresponde al subtipo de CCR hereditario más frecuente, representando aproximadamente entre 5 y 8% de los tumores colorrectales malignos⁷⁶. El origen de la enfermedad radica en la presencia de defectos en el sistema de reparación de los errores de replicación del ADN⁷⁷, debido a la existencia de mutaciones germinales de tipo autosómico dominante en cinco genes: i) el gen homólogo de MutS tipo 2 (*MSH2*) localizado en la región cromosómica 2p21; ii) el gen homólogo de MutL tipo 1 (*MLH1*) codificado en el cromosoma 3p31-p23; iii) el gen de segregación post-meiotica tipo 1 (*PSM1*) situada a nivel de 2q31-q33; iv) el gen de segregación post-meiotica tipo 2 (*PSM2*) codificado en el cromosoma 7p22; y, v) el gen homólogo de MutS tipo 6 (*MSH6*) codificado en la región cromosómica 2p21^{78,79}. La alteración de estos genes en el síndrome de Lynch se asocia con la pérdida de funcionalidad de las proteínas que codifican, lo cual conlleva la aparición de inestabilidad de microsatélites, asociada a una inestabilidad genómica generalizada^{77,80}. Además de las mutaciones puntuales de estos genes, se han descrito otras alteraciones genéticas y epigenéticas, como la hipermetilación de las islas CpG del promotor del gen *MLH1*, capaces de conferir un fenotipo idéntico al del déficit de expresión de las proteínas codificadas por los genes antes mencionados.

- B. Síndromes polipósicos. Este subgrupo de CCR hereditario corresponde únicamente al 1% de todos los CCR hereditarios^{76, 81}. Genéticamente este tumor se caracteriza por ocurrir en sujetos que presentan mutaciones germinales autosómicas dominantes del gen *APC* (Adenomatous Poluposis Coli, codificado a nivel de la región cromosómica 5q21-q22. Aunque se han detectado multitud de mutaciones en los diferentes codones del gen *APC* asociadas a los diferentes síndromes polipósicos, las más frecuentes incluyen deleciones e inserciones de pares de bases que conllevan cambios en el marco de lectura del gen, originando como resultado final, proteínas truncadas^{75, 76, 82}. Desde el punto de vista funcional, la proteína *APC* está implicada en numerosos procesos celulares relacionados con la vía de señalización de señalización WNT/ β -catenina⁸³, en la que interviene como molécula inhibidora. 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 oncogen *C-MYC*, promoviendo la proliferación celular⁷⁵.
- C. Síndromes polipósicos hamartomatosos. Este subgrupo de CCR hereditario engloba síndromes raros, caracterizados por presentar hamartomas en diferentes localizaciones anatómicas, además del intestino. Desde el punto de vista genético, estos síndromes polipósicos se caracterizan por presentar mutaciones autosómicas dominantes en diferentes genes supresores de tumores como *LKB1* (síndrome de Peutz-Jeghers), *PTEN* (síndrome de Cowden) y *SMAD4* (poliposis juvenil) (Tabla 3).

Tabla 3. Características genéticas y moleculares de los síndromes polipósicos hamartomatosos y sus efectos.

SINDROME	GEN ALTERADO	RUTA DE SEÑALIZACION AFECTADA	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
Peutz-Jeghers	<i>LKB1</i>	Vía de TP53	74-76, 84-86
Cowden	<i>PTEN</i>	Vía de AKT/PI3K	72, 74-76, 86, 87
Poliposis Juvenil	<i>SMAD4</i>	Vía de TGF- β	74-76, 86, 88

- D. Otros síndromes hereditarios. En este cuarto subgrupo de CCR hereditario se engloban aquellos tumores en los que la alteración genética causante de CCR se transmite con un patrón de herencia recesivo, como ocurre en el CCR familiar tipo X, caracterizado clínicamente por presentar

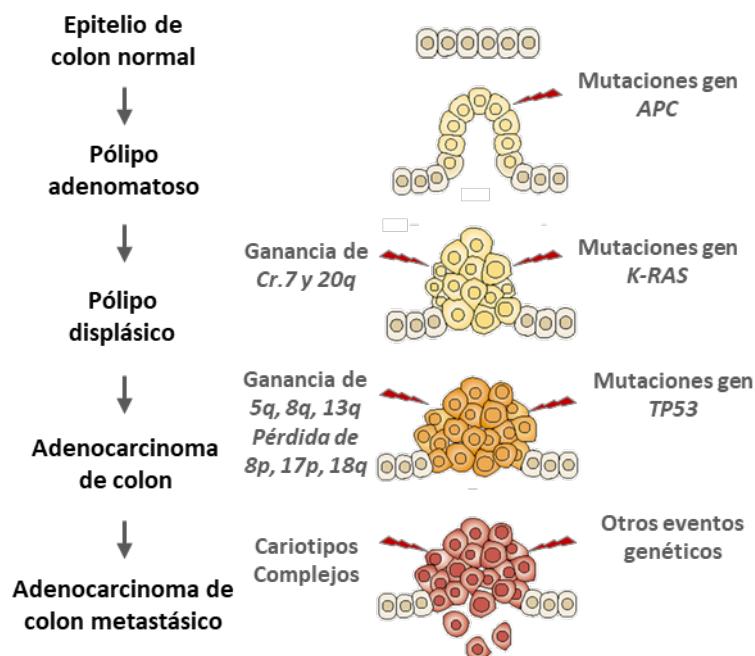
características idénticas a las del Síndrome de Lynch, en ausencia de alteración genética en el sistema de reparación de los errores de replicación del ADN^{89, 90}. Diferentes estudios han relacionado estos síndromes con la presencia de mutaciones en genes supresores tumorales como *RASSF9*, y con alteraciones citogenéticas a nivel de la región cromosómica 12p21 en la que se encuentran localizados diferentes genes asociados con proliferación celular como el gen *NTS*⁹¹.

Cabe señalar que todas las alteraciones genéticas hereditarias descritas anteriormente pueden aparecer de forma puntual en pacientes con CCR esporádicos, en ausencia de antecedentes familiares, habiéndose implicado también en estos casos dichas alteraciones genéticas, en la ontogenia y progresión del tumor.

2.2. CCR esporádico

El CCR esporádico constituye el subtipo genético más prevalente de CCR, representando más del 80% de todos los casos⁵. En la actualidad se cree que el CCR esporádico se desarrollaría en distintas etapas consecutivas a partir de células epiteliales normales, y en especial de sus precursores. Por ello, habitualmente presenta múltiples alteraciones genéticas asociadas a cambios histológicos y a un desequilibrio entre las funciones de proliferación, diferenciación y/o muerte celular. Fearon y Volgsetein fueron los primeros en definir en 1990 la posible secuencia de acumulación/adquisición de alteraciones genéticas involucradas en la ontogenia del CCR esporádico (Figure 7)⁹².

Figura 7. Secuencia de alteraciones genéticas/genómicas involucradas en la ontogenia y progresión del CCR esporádico, desde células epiteliales normales pasando por los diferentes estadios polipósicos intermedios hasta la aparición del adenocarcinoma colorrectal.



El modelo de evolución tumoral propuesto por estos autores está basado en los perfiles de alteraciones genéticas asociadas a distintos diagnósticos histopatológicos (e.j. pólipo adenomatoso, pólipo displásico, adenocarcinoma y adenocarcinoma metastásico), infiriendo estos autores que dichos subtipos histopatológicos constituyen diferentes etapas de desarrollo del tumor^{92, 93}. En este sentido, Fearon y Vogelstein definen dos tipos de alteraciones genéticas: i) las alteraciones genéticas primarias presentes desde las etapas más tempranas de la enfermedad, entre las que se encuentran las mutaciones de los genes *APC* y *KRAS* así como las ganancias de los cromosomas 7 y 20q, y, ii) las alteraciones genéticas secundarias, como las mutaciones del gen *TP53* y las alteraciones en el número de copias de múltiples cromosomas (e.j. 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 invasiva⁹³.

2.2.1. Alteraciones genéticas primarias

En la actualidad se considera que en el origen del CCR esporádico están involucradas principalmente mutaciones genéticas puntuales, asociadas a la inactivación de genes supresores de tumor y/o la activación

de oncogenes (Tabla 4)⁹⁴⁻⁹⁶. Así, en el CCR la alteración genética primaria más prevalente sería la mutación del gen *APC* presente en la mayoría (70-80%) de los casos⁹⁴; esta alteración se considera estaría involucrada en la transformación maligna de la célula epitelial intestinal al estar presente también ya en 75% de los adenomas, una frecuencia similar a la observada en el estadio de adenocarcinoma⁷⁵. Las mutaciones del gen *APC* presentes en el CCR esporádico conllevan la activación de la ruta de señalización de WNT/ β -catenina⁸³, asociándose a su vez con un aumento en la tasa proliferativa de la célula tumoral, en ausencia de respuesta al efecto inhibitor de la proteína APC.

Al igual que ocurría con las mutaciones del gen *APC*, las mutaciones del oncogén *KRAS* (*Kirsten Ras*) se considera 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^{92, 94}. Las mutaciones de *KRAS* afectan a 20% de los adenomas y a 40% adenocarcinomas colorrectales, siendo las más frecuentes aquellas que afectan a los codones 12 y 13 de este gen (80% de las mutaciones detectadas)^{39, 94, 97, 98}. Este oncogén, 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 merece destacar la proliferación, diferenciación y supervivencia celular^{99, 100}. En la actualidad, la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* condiciona el tipo de tratamiento de pacientes con CCR, al haberse demostrado su asociación con el grado de sensibilidad vs. resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR^{48, 49, 57}.

Otras alteraciones genéticas primarias descritas en el CCR esporádico, incluyen las mutaciones del gen *TP53*, presentes en más de la mitad de los casos. Las mutaciones de *TP53* están presentes ya en las fases más avanzadas de adenoma (20%) afectando a la gran mayoría (75%) de los adenocarcinomas colorrectales^{92, 93}. Desde hace décadas se conoce que *TP53* actúa como gen supresor tumoral, con un papel central en la inducción de apoptosis asociada a daño en el ADN¹⁰¹. Las alteraciones de este gen, ya sean mutaciones asociadas o no a deleciones de la región cromosómica 17p13 (60%) en la que se encuentra localizado este gen^{64, 102-105}, conllevan la producción de una proteína funcionalmente alterada y que favorece la supervivencia y el crecimiento del tumor⁹⁴. A nivel clínico, las alteraciones de *TP53* se asocian a

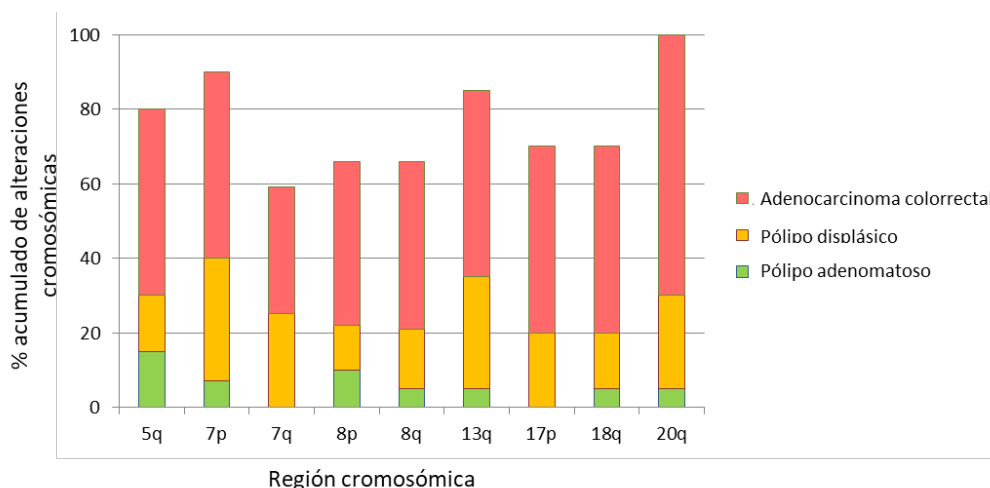
estadios avanzados de la enfermedad, relacionándose con los procesos de invasión vascular y linfática en los CCR distales¹⁰⁶; además constituyen un factor predictivo de la respuesta a distintos tratamientos^{62, 64, 65}.

Tabla 4. Frecuencia de las mutaciones genéticas primarias más frecuentes en el adenoma y el carcinoma colorrectal esporádico.

	GEN MUTADO	FRECUENCIA DE MUTACIONES		REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
		ADENOMA (%)	CCR (%)	
GENES SUPRESORES DE TUMOR	<i>APC</i>	59-82	52-80	75, 83, 94-96
	<i>TP53</i>	4-26	51-74	92-94, 107
	<i>DCC</i>	5-15	25-50	94, 108, 109
ONCOGENES	<i>KRAS</i>	12-34	35-41	94, 97, 98

La inestabilidad genómica asociada al CCR esporádico, además de estar implicada en la aparición de las mutaciones genéticas antes referidas, se traduce también en la adquisición de pérdidas y/o ganancias de ≥ 1 cromosomas o regiones cromosómicas, que con relativa frecuencia dan lugar a cariotipos complejos con múltiples alteraciones cromosómicas de tipo numérico y estructural (Figura 8)^{94-96, 108, 110-112}.

Figura 8. Frecuencia de alteraciones cromosómicas primarias en distintos tumores colorrectales esporádicos histológicamente benignos y malignos.



Así, se han identificado como las alteraciones cromosómicas primarias más prevalentes la pérdida de las regiones cromosómicas 5q, 17p12-p13 y 18q21, donde, se encuentran codificados los genes *APC* (5q21-q22), *TP53* (17p12-p13) y *DCC* (18q21), entre otros^{95, 104, 111, 113}. Este último gen *DCC*, (abreviado del inglés “*Deleted in Colorectal Cancer*”), está codificado en la región cromosómica 18q21 y sufre diferentes

alteraciones entre las que se incluyen mutaciones puntuales y pérdidas alélicas, que afectan al 70% de los CCR esporádicos^{91,100,101}. Ambos tipos de alteraciones del gen *DCC* 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 apoptosis¹⁰², asociada desde el punto de vista pronóstico a una SG significativamente acortada¹⁰⁹.

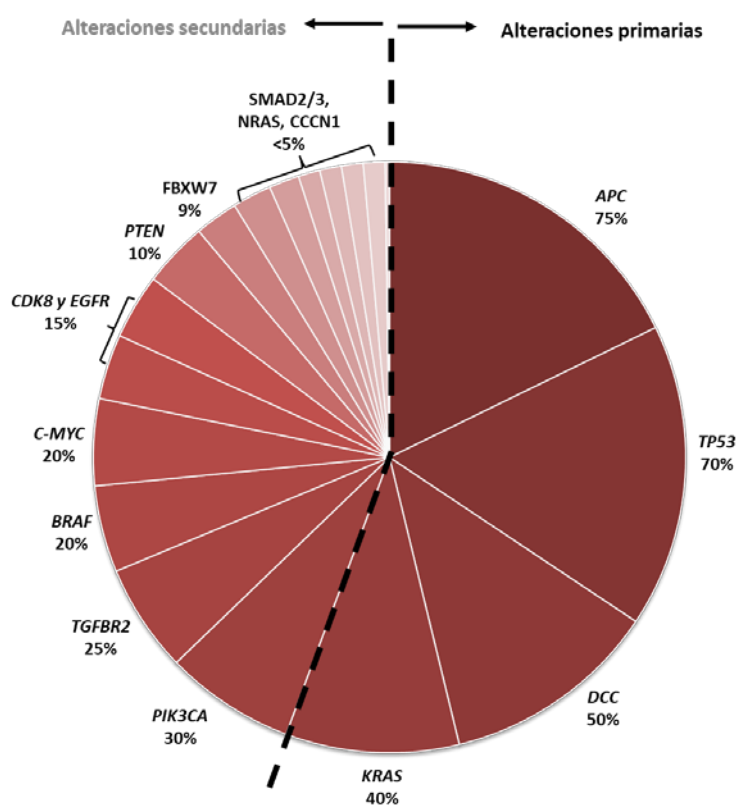
A su vez, las ganancias cromosómicas más frecuentemente detectadas en el CCR corresponden a las ganancias de los cromosomas 7, 8q, 13q, y 20q^{104, 113, 114}. De todas ellas, las ganancias del cromosoma 7 tienen especial relevancia clínica al estar codificados en este cromosoma genes involucrados directamente en la ontogenia 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 -catenina¹¹⁵. Cabe señalar además que el gen *EGF*, se encuentra localizado también en el cromosoma 7, en la región 7p12, constituyendo la proteína que codifica la diana terapéutica de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR empleados en la actualidad en el tratamiento del CCR¹¹⁶. A su vez, las alteraciones numéricas que afectan al cromosoma 8 se caracterizan principalmente por pérdidas del brazo corto del mismo –del(8p)– afectando a las regiones en las que se localizan varios genes supresores de tumoral como *PPP2CB* y *MTUS1*, cuya pérdida se ha asociado a menor SG¹¹⁷; a su vez, las ganancias del brazo largo del cromosoma 8 con relativa frecuencia involucran regiones que incluyen el oncogén *C-MYC*, cuya sobre-expresión se ha asociado también a un pronóstico adverso en el CCR esporádico¹¹⁸. La ganancia del brazo largo del cromosoma 13q constituye uno de los eventos genéticos más frecuentes, estando presente en más del 50% de los CCR esporádicos. Esta alteración se ha asociado con la progresión de la enfermedad ya que en ella se encuentran codificados genes involucrados en el control de la proliferación celular como *GPC5*¹¹⁹, y el gen *IGF2 (IRS2)* que codifica para un receptor de factores de crecimiento tipo insulina¹¹³. Finalmente, la ganancia de la región cromosómica 20q constituye también una de las alteraciones genéticas más frecuentes en el CCR (20-75% de los casos) apareciendo ya en el estadio de adenoma; en esta región cromosómica se localizan siete genes distintos (*C20ORF24*, *AURKA*, *RNPC1*, *TH1L*, *ADRM1*, *C20ORF20* y *TCFL*) que se han relacionado directamente con procesos de

inestabilidad cromosómica implicados en la ontogenia y la transformación maligna de los tumores colorrectales^{111, 120}.

2.2.2. Alteraciones genéticas secundarias

La inestabilidad genómica inherente a las más avanzadas de la evolución del CCR, conlleva la adquisición de un número aún mayor de nuevas alteraciones genéticas secundarias, implicadas de forma directa en la progresión y mayor agresividad del tumor, al favorecer su crecimiento y/o capacidad de invasión^{93, 94, 113} (Figura 9).

Figura 9. Frecuencia relativa de alteraciones genéticas primarias y secundarias que afectan a genes involucrados en la ontogenia y progresión de los tumores colorrectales esporádicos.



De entre otras alteraciones genéticas consideradas secundarias, al ser características de los estadios más avanzados del CCR esporádico, merece destacar aquellas mutaciones que afectan a genes que codifican para proteínas integrantes de la vía de señalización TGF- β , involucradas en procesos de diferenciación celular y en la progresión metastásica del CCR. Entre estos genes se incluyen los genes de la

familia *SMAD*: *SMAD2*, *SAMD3* y *SMAD4*. En este contexto, tras analizar el estado mutacional de estos tres genes, Fleming *et al.* han concluido que todos ellos presentan un espectro mutacional diverso en el CCR, siendo la mayoría de las mutaciones detectadas mutaciones patogénicas inductoras de inestabilidad en las proteínas mutadas y pérdida de su capacidad funcional efectora, asociándose además de forma específica las mutaciones de *SMAD4* con CCR de tipo mucinoso¹²¹⁻¹²⁴. Otro gen involucrado en esta vía de señalización y que se encuentra alterado de forma habitual en el CCR es el gen *TGFBR2*^{125, 126}, que codifica para un receptor con capacidad de fosforilar proteínas de la familia *SMAD*, alterando así, la vía de señalización de TGF- β con el consiguiente aumento de la proliferación celular^{127, 128}.

Como hemos comentado anteriormente, 75% de los CCR presentan alteraciones que afectan al gen *APC*, con la consiguiente alteración (activación) de la vía de señalización de WNT/ β -catenina, involucrada en la ontogenia del CCR. Además de estas mutaciones en *APC*, en el CCR esporádico se han identificado mutaciones en otros genes que están también implicados de forma directa o indirecta en esta vía como el gen *CTNNB1*^{121, 129} (mutado en la mitad de los CCR, habitualmente en ausencia de mutación/alteración del gen *APC*) y del gen *CDK8* (amplificado también en pacientes con CCR a los que confiere una mayor tasa de progresión)¹³⁰.

En la actualidad se considera que las alteraciones genéticas que afectan a vías de señalización asociadas a receptores de factores de crecimiento se asocian, en términos generales en el CCR, con mayor agresividad tumoral¹³¹. En este sentido en pacientes con CCR, se han identificado tanto mutaciones como amplificaciones del gen *EGFR*^{116, 132} haciendo de este receptor una diana terapéutica del CCR. Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido establecer una relación directa entre estas alteraciones y la eficacia de los tratamientos anti-EGFR. A modo de ejemplo, Yang *et al.* analizaron el valor predictivo de la amplificación de *EGFR* y la respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR sin encontrar una asociación clara entre ambas¹³². Esto podría ser debido, al menos en parte, a que han identificado otras alteraciones genéticas secundarias en tumores colorrectales que afectan a genes involucrados en las principales vías efectoras de EGFR, como las vías de MAPK/ERK y PIK3/AKT y que sí parecen tener un elevado valor predictivo, tanto en lo que a la respuesta al tratamiento se refiere, como en lo que dice respecto al

pronóstico de la enfermedad^{48, 49, 53}. De entre estos genes cabe destacar dos genes pertenecientes a la vía de señalización MAPK/ERK: *BRAF* y *NRAS*. La mutación V600E de *BRAF*, a pesar de ser una alteración secundaria, tiene un potente valor pronóstico, asociándose su presencia con periodos de respuesta al tratamiento y tiempos libres de progresión más cortos, lo que confiere, junto a la presencia de mutaciones en *KRAS*, información relevante a la hora de seleccionar el tratamiento más idóneo para cada paciente^{37, 39, 59}. Otro gen implicado en la vía MAPK/ERK y mutado de forma recurrente en pacientes con CCR esporádico, es *NRAS*, cuyas mutaciones se asocian^{39, 98} a un crecimiento acelerado del tumor, mayor supervivencia celular, y tasas de respuesta a tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR más elevadas. Las mutaciones en *PIK3CA*^{59, 60, 62, 98, 133}, un gen involucrado en la vía de señalización PIK3/AKT efectora de EGFR, están presentes también en 20% de los CCR, asociándose de forma directa con la respuesta al tratamiento con cetuximab y panitumumab, a pesar de que su determinación no está incluida en las recomendaciones de las guías oncológicas internacionales.

Otras alteraciones genéticas secundarias presentes en pacientes con CCR esporádico son las mutaciones del gen *FBXW7*^{134, 135} que codifica para una proteína involucrada en la proteólisis dependiente de ubiquitinación de varias proteínas codificadas por oncogenes, entre los que se incluyen *CCNE1* y *C-MYC*, que cuando aumentan su capacidad funcional, conllevan un incremento de la proliferación y supervivencia celular. En uno de los estudios más amplios realizados hasta la fecha, Chang *et al.* analizaron el estado mutacional de este gen en 1500 muestras de pacientes con CCR, sin llegar a encontrar una asociación clara entre las mutaciones de *FBXW7* y las características clínico-biológicas de la enfermedad¹³⁵.

A nivel citogenético, se han identificado también alteraciones cromosómicas secundarias, tanto de tipo numérico como estructurales, relacionadas algunas de ellas directamente con la progresión de la enfermedad^{111, 112}. En este sentido, la presencia de amplificación en regiones cromosómicas concretas como 7p12 y 8q24, donde se ubican los genes *EGFR* y *C-MYC* respectivamente, afectan aproximadamente a 10% de los casos asociándose con un comportamiento clínico más agresivo del tumor^{95, 96, 104, 111, 114}. De igual forma, se han detectado pérdidas en distintas regiones cromosómicas, asociadas a un pronóstico

adverso^{96, 104, 111, 114}; de ellos merece destacar las deleciones de 1p (25%), y 22q (12%), asociadas a un mayor potencial invasiva del tumor^{136, 137} y la presencia de afectación ganglionar¹³⁸, respectivamente.

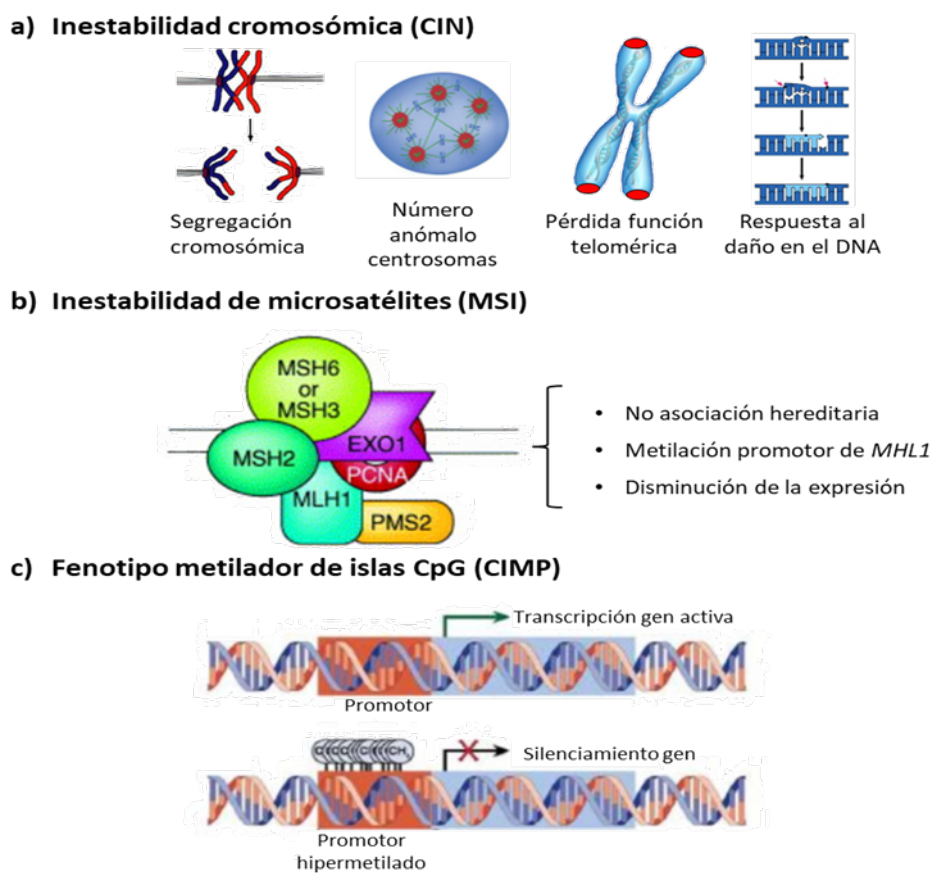
2.2.3. Mecanismos de inestabilidad genómica y vías de señalización involucradas en el CCR esporádico

En esta sección se describen de forma abreviada los mecanismos moleculares implicados en la inestabilidad genómica causante de la progresión de la enfermedad, así como las vías de señalización celulares, que resultan alteradas con mayor frecuencia en el CCR esporádico.

2.2.3.1. Mecanismos moleculares involucrados en la inestabilidad genómica del CCR esporádico

La adquisición de múltiples alteraciones a nivel genómico en las células presentes en la cripta del colon, asociada a la influencia ejercida por distintos factores ambientales, conlleva al desarrollo de un estado de inestabilidad genómica, que contribuye al origen, transformación maligna y progresión del CCR esporádico. En la actualidad se reconoce la existencia de al menos tres mecanismos genéticos distintos causantes de esta inestabilidad: i) inestabilidad cromosómica (CIN), ii) inestabilidad de microsatélites (MSI), y iii) fenotipo metilador de las islas CpG (abreviado del inglés como CIMP) (Figura 10)^{108, 124, 139-141}.

Figura 10: Principales mecanismos moleculares involucrados en la inestabilidad genómica implicados en el origen y progresión del CCR esporádico.



Inestabilidad cromosómica (CIN). La CIN está presente en 65-70% de los casos con CCR esporádico¹⁴² y suele asociarse a la adquisición de alteraciones genéticas en secuencias pre-definidas como la descrita por Fearon y Volgsetein en 1990⁹². En términos generales, la CIN conlleva un proceso de aneuploidización progresiva con un número cada vez mayor de alteraciones cromosómicas de tipo numérico, amplificación de determinadas regiones cromosómicas y pérdida de heterocigosidad (LOH)^{108, 139, 142}. La CIN puede ser consecuencia de alteraciones en diferentes procesos asociados a la mitosis y en especial, a aquellos implicados en la segregación cromosómica^{143, 144}, reflejando habitualmente la formación de un huso cromático anómalo con un número anormal de centrosomas. Entre los mecanismos moleculares implicados

en la CIN, se han observado niveles aumentados de expresión de quinasas asociadas a los centrómeros, como *AURKA* y *PLK1*, particularmente en CCR esporádicos en estadios avanzados de la enfermedad^{142, 143, 145}. Asimismo, la pérdida de la función telomérica constituye otro de los mecanismos causantes de CIN¹⁴³. 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^{143, 146}, al demostrarse un aumento de la actividad telomerasa asociada a la inmortalización celular, en el momento de la progresión de CCR hasta entonces estables¹⁴³.

En condiciones normales, las células epiteliales de colon y recto, al igual que el resto de células de nuestro organismo, se protege del daño sufrido en su ADN mediante la activación de diferentes cascadas de señalización que culminan en la retención del ciclo celular el tiempo suficiente para que el ADN pueda ser reparado mediante diferentes mecanismos fisiológicos^{142, 143}. Entre ellos se incluyen: i) escisión de bases (BER), ii) reparación de rupturas en la doble hélice del ADN (DSBR), iii) escisión de nucleótidos (NER) y iv) sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR). Cuando el daño sufrido en el ADN celular sea irreparable, se inicia una cascada de señalización que conlleva la muerte celular por apoptosis o la senescencia celular. Algunas de las proteínas más relevantes implicadas en estos procesos son ATM, ATR, TP53, BRCA1 y BRCA2, habiéndose asociado la presencia de mutaciones en estos genes con diferentes síndromes que presentan mayor susceptibilidad a desarrollar tumor^{76, 147}. Sin embargo, en el CCR esporádico, hasta el momento únicamente se han identificado evidencias claras de la implicación de las alteraciones del gen *TP53* en este proceso de reparación del ADN^{64, 102}, por lo que esta sería la única proteína implicada en la supervivencia de las células tumorales con CIN, en CCR esporádico.

Inestabilidad de microsatélites (MSI). La MSI está presente en alrededor de 15% de los CCR esporádicos¹⁴². Se trata de un mecanismo implicado en el CCR hereditario, y en concreto, en el Síndrome de Lynch. En términos generales, la MSI se define por la presencia de mutaciones inactivantes de genes del complejo de reparación de ADN responsables de corregir los errores de replicación: *MLH1*, *MSH2*, *MHS6*, *PSM1* y *PSM2*^{78, 148}. A su vez, los CCR esporádicos con MSI se caracterizan por: i) no presentar asociación hereditaria/familiar, ii) mostrar frecuentemente metilación bialélica del promotor del gen *MHL1* (80% de

los casos), iii) tener menor expresión proteica de MLH1 y PSM2, iv) junto a cariotipos diploides (en cerca del 70-75% de los casos), v) mutación V600E del gen *BRAF*^{78, 141, 148}, y iv) asociar a enfermedad metastásica. Además, los CCR esporádicos con MSI elevada muestran mejor pronóstico asociado a una mayor SG, respecto a los que presentan MS estable⁷⁸, especialmente entre pacientes en los que existe afectación ganglionar y/o tumores en estadio III^{149, 150}. La determinación del grado de inestabilidad de microsatélites en el CCR constituye un factor clave a la hora de definir el abordaje terapéutico más adecuado, ya que los casos con inestabilidad de microsatélites elevada son resistentes a los fármacos citostáticos de la familia del 5-FU^{35, 50, 51}. Por el contrario, estudios recientes basados en inmunoterapia asocian esta alteración con una respuesta favorable a anticuerpos monoclonales anti-PDL1⁶⁶. Desde el punto de vista más práctico, la determinación de la inestabilidad de MSI puede realizarse mediante técnica de inmunohistoquímica (IHC) dirigida a evaluar los niveles de expresión celular de las proteínas implicadas y/o empleando técnicas de biología molecular enfocadas al análisis del estado mutacional de los genes más frecuentemente alterados (por ejemplo, *MLH1* y *PSM2*⁷⁸).

Fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). Alrededor de 18% de los CCR esporádicos muestran fenotipo metilador de islas CpG¹⁴². Las islas CpG están constituida por agrupaciones de dinucleótidos de citosina y guanina, presentes en las regiones promotoras de determinados genes. La metilación de las citosinas del promotor conlleva la inactivación de la transcripción, siendo frecuente en el CCR la hipermetilación de las islas CpG a nivel de los promotores de genes supresores tumorales¹⁵¹. Aproximadamente la mitad de las CIMP presentes en el CCR esporádico corresponden al promotor del gen *MLH1*¹⁵².

En los últimos años, se han diseñado diferentes paneles de marcadores dirigidos al análisis del patrón de metilación del DNA de los promotores de distintos genes supresores tumorales involucrados en la inducción de apoptosis o la inhibición de la angiogénesis. De ellos merece destacar, además de los paneles clásicos en los que se analizan los genes *MLH1*, *p16*, *MINT1*, *MINT2* y *MINT31*, un panel más completo que incluye además de estos 5 genes, los genes *CACNA1G*, *CRABP1*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *HIC1* y *IGFBP3*¹⁵³. Los resultados derivados de los

análisis realizados con estos paneles, y su relación con las diferentes características clínicas y genéticas de la enfermedad, han permitido identificar la existencia de una estrecha relación entre un CIMP-elevado y determinadas mutaciones como la mutación V600E de *BRAF* (61%); así, mientras que un CIMP-bajo se relaciona con mutaciones en el gen *KRAS* (45%)¹⁵³, Vedel *et al.* han identificado un grupo de pacientes con CCR caracterizados por CIMP-elevado en ausencia de alteraciones en microsatélites y presencia de mutación V600E de *BRAF*, que presentan baja SLE y SG^{153, 154}.

2.2.3.2. Vías de señalización celular asociadas al CRC esporádico

Durante las últimas décadas se ha avanzado de forma notable en el conocimiento de las alteraciones genómicas involucradas en el origen y progresión del CCR esporádico. No obstante, el verdadero reto está en la identificación del grado de afectación funcional de las vías de señalización alteradas como consecuencia de dicho cambios genómicos, y su impacto en el funcionamiento de vías relacionadas con las mismas. En este sentido, se ha podido establecer que a pesar del gran número de anomalías genéticas características del CCR esporádico, las vías de señalización que se ven afectadas se concentran en menos de una veintena^{124, 155-157}, siendo las vías de señalización intracelular más frecuentemente alteradas objeto de esta sección de la introducción de la memoria (Figura 11).

Vía de señalización de WNT/ β -catenina. 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^{158, 159}.

En el CCR, la vía de señalización de WNT/ β -catenina se encuentra alterada en la gran mayoría de los tumores (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* son más frecuentes en pequeños adenomas con poder invasivo limitado¹⁶⁰, las

mutaciones en el gen *APC* se asocian a tumores invasivos de mayor tamaño. El 80% de los CCR presentan niveles elevados de β -catenina a nivel nuclear, como consecuencia de mutaciones en los genes *APC* y *CTNNB1*¹⁶⁰, que amplifican su función efectora, encargada de activar factores de transcripción nucleares. Además, en algunos tumores se han identificado mutaciones específicas del gen que codifica para β -catenina, capaces de inducir también un aumento de su capacidad funcional^{115, 161}.

Vía de señalización de Notch. Esta ruta de señalización debe su nombre a los receptores celulares Notch, cuatro proteínas transmembrana formadas cada una de ellas por dos dominios: el dominio extracelular que se une a diferentes ligandos, y el dominio intracelular con capacidad catalítica¹⁶². Todas 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, esencialmente a nivel de las células Globet¹⁵⁶.

En la actualidad se cree que 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 casos¹⁶³. 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 denominada transición epitelio-mesénquimal (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 Notch 1¹⁶⁴. En el CCR se han identificado niveles de expresión elevados tanto de ligandos (DLL y Jagged) como de receptores de Notch, habiéndose asociado la sobre-expresión de Notch1 y Hes1 con una SG más alargada, mientras que las alteraciones en la regulación de Notch3, Jagged1 y Dh4 se han relacionado con i) fenotipos más agresivos¹⁶⁵, asociados a un aumento de la proliferación celular, y a ii) alteraciones importantes en la diferenciación de las células Globet y la formación de secreciones mucosas.

Vía de señalización Hedgehog. La vía de señalización Hedgehog representa una vía esencial en la regulación y mantenimiento de las células madre, la polaridad, migración celular y el proceso de diferenciación durante el desarrollo embrionario^{156, 166, 167}. 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 invasiva¹⁶⁸. Así, a modo de ejemplo, Zang *et al.* observaron un aumento gradual de la expresión de las proteínas Smo y Gli1 en la transición adenoma-adenocarcinoma¹⁶⁹, mientras que Hong *et al.*¹⁷⁰ han asociado la sobre-expresión de Gli1 con invasión linfática del tumor y progresión de la enfermedad, y Varnat *et al.* demostraron la existencia de una relación entre el aumento de la expresión de las proteínas, Gli1, Ptch1, Gli2, Shh e Hip, involucradas en esta vía de señalización, y la aparición de metástasis¹⁶⁸.

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 celular¹⁵⁶. Habitualmente, el tejido epitelial 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. Esta vía se ha descrito estaría 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 inmunosupresión^{171, 172}. 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 celular^{172, 173}.

En alrededor de una cuarta parte (25%) de los CCR, se ha identificado la presencia de mutaciones en el receptor de TGF- β tipo II, asociadas a pérdida de función, principalmente en casos que presentan inestabilidad de MS¹²⁵. No obstante, las alteraciones con mayor implicación en la desregulación de esta vía

de señalización descritas hasta la fecha, hacen referencia a mutaciones y otras alteraciones genéticas que afectan a las proteínas SMAD, especialmente a aquellas que se encuentran codificadas en el cromosoma 18 (*SMAD2* y *SMAD4*)^{123, 173}. Como hemos descrito previamente, las mutaciones y/o deleciones en estos genes¹²², 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 colon¹²⁵. Todas estas alteraciones en los componentes de esta cascada de señalización bloquean la vía TGF- β , actuando como promotores del desarrollo tumoral^{128, 171}. 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 metastatización^{171, 174}, en las que estarían implicados diferentes mecanismos. En este sentido, cabe señalar que Calon *et al.* han implicado también la alteración de esta vía de señalización en la modificación del microambiente tumoral haciéndolo favorecedor de un fenotipo más invasivo¹⁷¹, y Massagué *et al.* refieren su implicación en el proceso de EMT al inducir expresión de Snail, Slug y Twist¹⁷⁴.

Vías de señalización celular asociadas a la activación de factores de crecimiento. La existencia de un aumento de los niveles de expresión tanto de factores de crecimiento como de sus receptores celulares, en el CCR, ha sido ampliamente descrita en la literatura^{116, 131}. Entre todos los factores de crecimiento involucrados en el CCR, merece destacar EGF y VEGF, por su relevancia a nivel biológico y por las implicaciones terapéuticas que conllevan^{53, 54}. **EGF**, al unirse a su receptor en la superficie celular (EGFR), promueve la supervivencia (protege de la apoptosis) y facilita la invasión y la angiogénesis, favoreciendo de este modo la progresión del tumor¹⁷⁵. En este contexto, diferentes estudios han demostrado la existencia de sobreexpresión de EGFR en al menos 20% de los CCR⁵⁴, y alteraciones (amplificación) del gen en el 80% de los casos¹³². De acuerdo con la relevancia biológica de estas alteraciones, el desarrollo de terapias basadas en anticuerpos monoclonales anti-EGFR ha mostrado un efecto beneficioso en el tratamiento del CCR, especialmente entre pacientes que presentan enfermedad metastásica^{48, 49, 53}.

VEGF al unirse a su receptor de membrana, VEGFR, regula la angiogénesis¹⁷⁶. El aumento de la actividad VEGF/VEGFR a nivel tumoral se traduce en un aumento de la supervivencia, migración, y de forma

más significativa aún, la angiogénesis¹⁷⁷. En este sentido, merece destacar que VEGF no solo tiene efecto directo sobre las células tumorales y la vascularización, sino que además inhibe el sistema inmune, lo cual promueve aún más si cabe, la progresión tumoral¹⁷⁸, haciendo de VEGFR una de las dianas terapéuticas habitualmente más empleadas en el CCR^{48,49}.

Además de EGF/EGFR y de VEGF/VEGFR, la familia de los **factores de crecimiento tipo insulina** (IGF1 e IGF2) juega también un importante papel en el CCR. Tanto IGF1 como IGF2 tienen funciones clave en el crecimiento en la infancia y en el control del metabolismo anabólico en los adultos, principalmente IGF1^{179, 180}. La detección de niveles de expresión elevados de IGF1 y su receptor en el CCR se han asociado de forma específica con linfogénesis y procesos de invasión tumoral^{180, 181}.

En conjunto, la alteración de las vías de señalización asociadas a los factores de crecimiento antes referidos implica la activación de diferentes cascadas de señalización cuyo resultado final es el desarrollo, supervivencia, crecimiento e invasión tumoral¹⁷⁹, debido a su confluencia en vías de activación efectoras, entre las que merece destacar la vía de MAPK/ERK (70% de los casos) y la vía de PIK3/AKT (50%), que son las vías verdaderamente capaces de inducir el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la migración celular.

Vía de señalización MAPK/ERK o RAS/RAF/MEK/MAPK/ERK. Esta vía de señalización constituye una de las vías de señalización más complejas, al estar regulada por un número importante de otras vías de señalización¹⁵⁸. En conjunto, 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, (especialmente KRAS), activadas habitualmente por señales extracelulares y encargadas de iniciar una cascada de fosforilación/activación de las quinasas de la familia RAF (CRAF1, ARAF y BRAF), que concluye con la activación secuencial de las proteínas MAPKK (MEK1 y MEK2) y MAPKS efectoras finales (ERK1 y ERK2). ERK1 y ERK2 migran al núcleo celular donde interactúan con varios factores de transcripción encargados de promover el ciclo celular¹⁸². 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 celular⁹⁹. 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. Así,

la mutación más frecuentemente detectada del gen *BRAF* (*BRAF* V600E) se ha asociado con un pronóstico adverso en pacientes con CCR con recaída precoz, y con una SG significativamente más corta, debido a una mayor resistencia al tratamiento^{37, 39}. Por ello, actualmente las guías oncológicas internacionales recomiendan la determinación del estado mutacional de estos genes (codones 12 y 13 del exón 2 de *KRAS* y la mutación V600E de *BRAF*) para seleccionar el protocolo terapéutico más adecuado para cada paciente^{48, 49}.

Vía de señalización de PIK3/AKT. La vía de señalización PIK3/AKT incluye una serie de proteínas con actividad Quinasa cuya función es la fosforilación de fosfolípidos, principalmente de inositol. 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, enzima responsable a su vez de la fosforilación de AKT, capaz de activar diferentes factores de transcripción, y cuya acción se traduce en un aumento de la supervivencia y de la proliferación celular¹⁸³. En esta vía juega un importante papel regulador la proteína PTEN, cuya actividad fosfatasa hace que actúe como inhibidor natural de PIK3, favoreciendo la apoptosis. En el CCR, se han descrito diferentes mutaciones germinales, activadoras del gen *PIK3CA* que codifica para la fracción catalítica de PIK3, y que son las responsables del Síndrome de Crowden⁸⁷; además, puntualmente (10% de los casos) se observan también mutaciones en este gen en el CCR esporádico⁵⁹. De igual forma se ha descrito la presencia de mutaciones inactivantes (9%) y/o deleciones (10%) del gen *PTEN* en el 15% de los CCR^{59, 87, 183}. Ambas alteraciones genéticas conllevan una inactivación de PTEN con la consiguiente activación constitucional de la vía efectora de PIK3/AKT. Clínicamente, Bohn *et al.* han relacionado las alteraciones de *PTEN* en el CCR, con una SG más corta de los pacientes¹⁸⁴. Así mismo, las mutaciones del gen *PIK3CA* influyen en la respuesta a cetuximab y panitumumab, siendo los pacientes con fenotipo silvestre aquellos que presentan respuesta más favorable^{59, 62}.

Vía de señalización de TP53. El gen *TP53*, localizado en 17p13, codifica para la proteína TP53 considerada una de las proteínas supresoras tumorales más relevantes, al actuar como coordinador central

de la respuesta celular al estrés, al daño en el ADN y/o a señales aberrantes de proliferación o estrés oxidativo^{94, 107, 185}. Globalmente, la vía de TP53 se ha definido como alterada en más de la mitad de los CCR (53% de los casos)¹⁵⁵. Así, hoy se considera que la pérdida de función de TP53 constituye uno de los eventos iniciales más habituales, no solo en el CCR, como en muchos otros tumores. En el CCR, la presencia de alteraciones (mutaciones y/o deleciones) de *TP53*, se observa ya en los estadios más tempranos de la enfermedad, afectando a 4-25% de las lesiones adenomatosas y hasta el 75% de los adenocarcinomas⁶⁴. En concreto, en los 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 función¹⁰². Las alteraciones de TP53 conllevan una inhibición de la apoptosis y un aumento de la supervivencia, y con ello, una proliferación celular descontrolada. Algunos autores han descrito la posible existencia de una asociación significativa entre determinadas alteraciones de este gen y la localización (y otras características clínicas) del tumor. Así, Schneider-Stock *et al.* afirman que las alteraciones en el codón 72 de *TP53* estarían relacionadas con una localización distal del tumor y la presencia de metástasis hepáticas¹⁸⁶.

Vía de señalización de NF-κB/INKK. NF-κB ha sido referido como un factor de transcripción clave en la ontogenia del CCR, estando íntimamente relacionado con la activación del sistema inmune, concretamente de la inmunidad innata, y la respuesta inflamatoria asociada a la misma¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. En este sentido, se ha descrito que los pacientes que presentan enfermedad inflamatoria intestinal tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR⁵, constituyendo estos casos aquellos en los que la activación de esta vía de señalización tendría mayor relevancia en el desarrollo del tumor. Así, se cree que la activación constitutiva de NF-κB/INKK 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 (*CYCLIN-D1*, *C-MYC*), genes con actividad anti-apoptótica de la familia de *BCL2*, y genes involucrados en la amplificación de la respuesta inflamatoria (*COX-2*)^{187, 189}. Además de haberse relacionado con la ontogenia tumoral, esta vía de señalización se ha involucrado también en la progresión del CCR, al promover diferentes procesos que

facilitan la diseminación tumoral a otros tejidos. Así, se ha descrito que la activación de NF- κ B facilita el proceso de EMT mediante la estabilización de proteínas involucradas en el mismo, como SNAIL, TWIST y CXCL1, asociándose su alteración en el CCR a una mayor frecuencia y grado de afectación ganglionar y a estadios más avanzados de la enfermedad^{187, 190}. Finalmente, la activación de NF- κ B/INKK se ha asociado también con una mayor actividad angiogénica, asociándose además, niveles elevados de NF- κ B a un pronóstico adverso^{188, 189}.

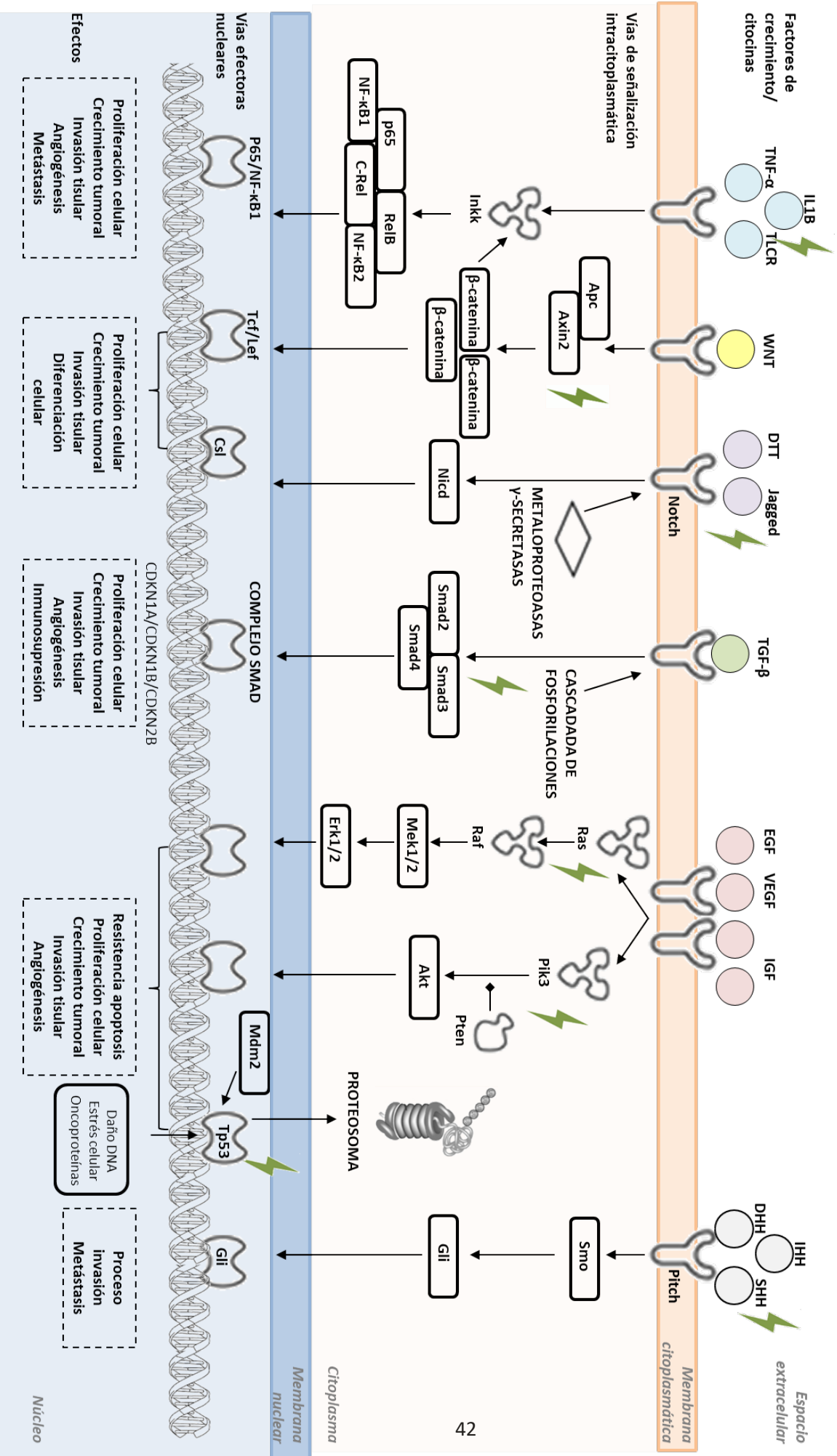
Ruta metabólica de los eicosanoides. Los eicosanoides son compuestos lipídicos extremadamente potentes con una vida media muy corta y actividad autocrina y paracrina. Entre la gran variedad de funciones que poseen estos compuestos merece destacar, la modulación del sistema inmune en diferentes enfermedades asociadas a procesos inflamatorios crónicos, como sucede en el caso del CCR¹⁹¹. Además, estarían implicados en procesos de apoptosis, motilidad celular, angiogénesis y metástasis, que tienen lugar durante el desarrollo del tumor¹⁹¹.

Diversos estudios en modelos murinos han constatado que la existencia de alteraciones en la ruta de los eicosanoides podría estar directamente relacionada con el desarrollo del CCR, lo cual estaría de acuerdo con la existencia de sobreexpresión de la enzima COX-2 en la mayoría (50-80%) de estos tumores. COX-2 es la enzima responsable de la síntesis de PGE₂, mediador lipídico fuertemente implicado en el desarrollo de tumores gastrointestinales, debido a su capacidad moduladora del sistema inmune y de provocar estrés oxidativo a nivel celular. En este sentido, se ha sugerido que la inhibición de COX-2 mediante, por ejemplo, el tratamiento con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos como el ácido acetil salicílico, podría tener un efecto beneficioso en enfermedades inflamatorias gastrointestinales, al disminuir el riesgo de desarrollo de tumor¹⁹².

En condiciones fisiológicas, todas las vías de señalización anteriormente descritas interactúan 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 (e.j. respuesta inmune) que promueve, no solo el mantenimiento y expansión del tumor, sino también su capacidad de invasión local y de diseminarse a distancia¹⁹¹.

Figura 11. Representación esquemática de las principales vías de señalización intracelular involucradas en el desarrollo, mantenimiento y progresión del CCR esporádico



2.2.4. Heterogeneidad genética del CCR a nivel intra-tumoral

El CCR es una enfermedad compleja en la que existe una gran variabilidad clínica y en la respuesta a los distintos tratamientos administrados, incluso entre casos que comparten características histopatológicas similares¹⁹³. Los análisis genéticos han mostrado además que los tumores de distintos pacientes presentan también perfiles genómicos diferenciales y con combinaciones de alteraciones genéticas muy variables que podrían en gran medida, ser las responsables de explicar la heterogeneidad clínico/biológica observada^{193, 194}. 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^{194, 195}.

Desde el punto de vista genético, los primeros estudios que evidenciaron ya la existencia de heterogeneidad intra-tumoral en el CCR emplearon técnicas de citogenética convencional (CC). Así, en los años 90 Pathak *et al.* al analizar mediante CC lesiones epiteliales malignas, evidenciaron la coexistencia en las mismas de distintos subclones de células tumorales, siendo cada uno de ellos portador de diferentes alteraciones cromosómicas⁹⁵. Esta heterogeneidad genética se ha visto se traduce a veces, 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^{195, 196}.

En términos generales, el concepto de heterogeneidad intra-tumoral y de evolución clonal son conceptos con aproximadamente 50 años¹⁹⁷, habiéndose postulado dos modelos de evolución clonal diferentes, no excluyentes^{198, 199}: el modelo de evolución lineal y el modelo del denominado “big bang”. El primer modelo se sostiene en la aparición de una alteración genética inicial en el clon fundador del tumor, generalmente consistente en mutaciones en genes supresores de tumor; posteriormente, este clon fundador adquiriría y acumularía nuevas alteraciones genéticas que se traducirían también en modificaciones fenotípicas de la célula tumoral^{200, 201}. En este sentido, en este modelo la adquisición de las distintas alteraciones moleculares de un tumor tendría un orden cronológico y se asociaría a la progresión

del tumor⁹⁴. En el segundo modelo, la aparición de múltiples perfiles de alteración genética constituiría el evento inicial del proceso de oncogénesis, traduciéndose en la coexistencia de diferentes clones celulares ancestrales dentro de un mismo tumor, cada uno de los cuales se expandiría y se mantendría a lo largo del tiempo, pudiendo a su vez ir adquiriendo alteraciones genéticas adicionales que generarían subclones celulares a partir de cada uno de los clones ancestrales, presentes en el tumor, en frecuencia inferior a la de las alteraciones genéticas de los clones ancestrales correspondientes^{198, 202}.

En cualquiera de los dos modelos, uno de los factores con mayor grado de implicación en la generación de heterogeneidad genética a nivel intra-tumoral serían por tanto, las modificaciones que el tumor va experimentando en el curso de su desarrollo natural y que suponen un proceso dinámico con la adquisición de (nuevas) alteraciones moleculares que llegan a modificar el fenotipo biológico de la célula y sus funciones²⁰³. En este sentido, uno de los principales factores involucrados en la génesis de la heterogeneidad genética a nivel intra-tumoral en el CCR se cree pueda ser el microambiente tisular^{204, 205}, caracterizado por una gran complejidad y dinamismo. Así se ha comprobado que la presencia de determinados factores de crecimiento, citocinas y/o hormonas en las lesiones asociadas a enfermedades inflamatorias intestinales, están habitualmente implicadas en los estadios iniciales de desarrollo del CCR, actuando como potentes moduladores del ecosistema de las células tumorales²⁰⁶. No obstante, hay que tener en cuenta que las células tumorales pueden también modificar drásticamente el microambiente del tejido en el que se encuentran, de modo a favorecer su propio crecimiento y expansión²⁰⁴, limitados en condiciones fisiológicas por las barreras arquitectónicas del tejido intestinal, susceptibles de ser modificadas por la acción del microambiente tumoral mediante por ejemplo, la promoción de la angiogénesis a nivel local^{200, 203, 204}. En el microambiente del tejido intestinal no solo intervienen factores intrínsecos al propio organismo, sino que este se ve afectado también por factores externos relacionados con los hábitos y el estilo de vida (e.j. dieta y el tabaquismo) del individuo que hoy se reconoce constituyen también factores de riesgo para el desarrollo del CCR⁵.

Así mismo, la heterogeneidad genética existente a nivel intra-tumoral se cree puede jugar también un importante papel en el proceso metastásico. 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, sugieren facilitar el desarrollo de un fenotipo invasivo y un comportamiento clínico más agresivos^{193, 194, 207, 208}. A modo de ejemplo, nuestro propio grupo, empleando técnicas de *i*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 las que 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 hígado²⁰⁹.

La heterogeneidad intra-tumoral tiene también importante implicaciones en lo que a la respuesta al tratamiento se refiere^{193, 210}, constituyendo, la coexistencia de subclones celulares con 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^{193, 194, 210}. 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 enfermedad²¹¹.

2.2.5. Genética del CCR metastásico

2.2.5.1. Alteraciones genéticas involucradas en el proceso metastásico

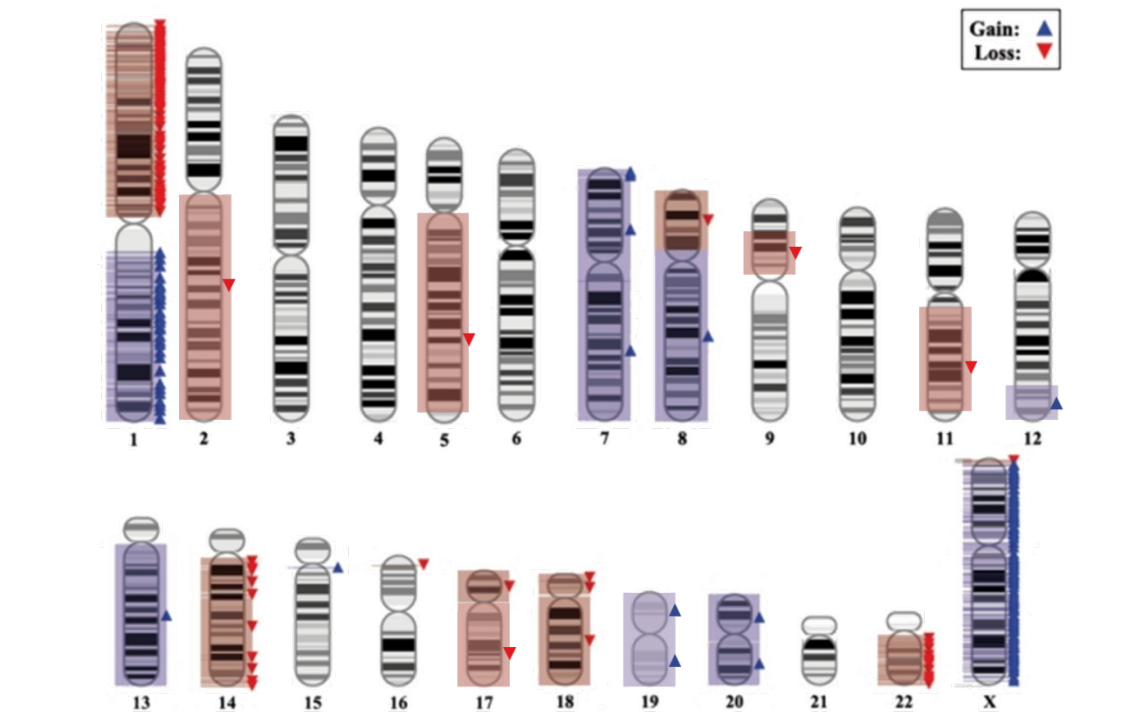
A pesar de los importantes avances alcanzados en el conocimiento de las alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo y progresión del CCR, las alteraciones genéticas concretas que pueden estar implicadas en el fenotipo metastásico, siguen siendo en gran medida desconocidas, probablemente debido a la mayor complejidad genética del CCR metastásico. Con el fin de avanzar en el conocimiento de las alteraciones genéticas involucradas en el proceso metastásico se han llevado a cabo diferentes estudios utilizando una gran diversidad de técnicas genéticas y moleculares, desde la CC, hasta técnicas de secuenciación masiva o de arrays de “alta densidad”, en las que se han analizado en paralelo tumores

primarios y sus correspondientes metástasis²¹²⁻²¹⁶. En general, estos estudios han mostrado la existencia de cariotipos complejos en los tumores primarios de pacientes con CCR metastásico, asociados a fenotipos celulares más agresivos, que típicamente incluyen la presencia de alteraciones, ya sean de tipo numérico o estructural, en ≥ 7 regiones cromosómicas, junto con la existencia de dos o más clones de células tumorales²¹²⁻²¹⁶. Asimismo, estos estudios han permitido identificar aquellas alteraciones genéticas que están presentes en los clones tumorales tanto del tumor primario como de sus metástasis hepáticas, diferenciándose de las (nuevas) alteraciones adquiridas de forma específica en las metástasis^{209, 217, 218}.

A modo de ejemplo, Sayagués *et al.* han demostrado a través del análisis simultáneo del número de copias de múltiples cromosomas (Figura 12) mediante técnica de FISH realizada sobre núcleos interfásicos (*i*FISH), que las deleciones de los brazos cromosómicos 17p y 18q, junto con las ganancias del cromosoma 7 o de las regiones cromosómicas 8q, 13q y 20q, están presentes casi de forma sistemática (aproximadamente 80% de los casos) en muestras pareadas de tumor primario y sus metástasis²⁰⁹, mientras que la ganancia de la región 1q y las pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 9p, 11q, 17q eran características específicas del tumor metastásico²⁰⁹. Estos hallazgos han sido confirmados mediante análisis genómico masivo empleando “arrays” de polimorfismo de nucleótido único (SNP) que permitieron identificar además alteraciones en nuevas regiones cromosómicas y que incluían pérdidas a nivel de del cromosoma 4 y 10q, y ganancias en 5p y 6p²¹⁹. Prácticamente de forma sistemática, en todas las regiones cromosómicas identificadas como alteradas en el CCR metastásico se localizan genes involucrados en los procesos de proteólisis (*MMP2*), adhesión (*CEACAM7*), angiogénesis (*ANGPT2*), diseminación (*ID1* y *BCL2L1*) y crecimiento celular (*ERBB2*) y/o genes asociados a la adaptación celular al microambiente hepático²²⁰. En esta misma línea, Knösel *et al.* analizaron la posible asociación entre determinadas alteraciones genómicas y el tipo de metástasis desarrolladas, encontrando una mayor frecuencia de pérdidas de los cromosomas 18 y 21q en metástasis ganglionares, y de deleciones de los brazos cromosómicos 2q, 5q, 8p, 9p, 10q, 11p y 21q, junto con ganancias de las regiones cromosómicas 1q, 11q, 12qter, 17q12-21, 19 y 22q, en las metástasis hepáticas, respecto a lo observado tumores CCR primarios. Estos hallazgos les llevaron a sugerir

que la diseminación tumoral por vía linfática y por vía hematogena podrían estar asociada a vías genéticas independientes y a fenotipos metastásicos distintos²²¹.

Figura 12: Representación esquemática del cariotipo de un tumor metastásico sincrónico de un CCR en el que se recogen las alteraciones cromosómicas más frecuentemente observadas en metástasis hepáticas de CCR (pérdidas y ganancias) (Adaptado de Muñoz-Bellvis *et al.*)²¹⁹



A nivel molecular, los primeros estudios encaminados a la identificación de las alteraciones genéticas involucradas en el proceso metastásico del CCR, se han centrado en el análisis del estado mutacional (de muestras pareadas de tumor primario y metastásico) del gen *KRAS*, observándose un elevado grado de concordancia entre ambos tipos de muestras, lo cual apoyaría la aparición temprana de esta alteración genética en la evolución de la enfermedad (evento primario)^{222, 223}. En esta misma línea, Vakiani *et al.* analizaron en un estudio posterior, el estado mutacional de cinco genes (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* y *TP53*) distintos en tumores CCR primarios y sus metástasis sincrónicas, observando también un elevado grado de concordancia entre los resultados obtenidos en ambos tipos de muestras para los genes *RAS* y *PIK3CA*; por el contrario, las mutaciones de *TP53* se veían incrementadas de forma significativa en su frecuencia en las metástasis²²⁴. En contraposición con estos resultados, otros autores no han podido confirmar estos hallazgos, al encontrar discrepancias significativas en el estado mutacional de estos genes entre tumores primarios y sus correspondientes metástasis. Así, Li *et al.* analizaron el estado mutacional de

los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* en muestras pareadas de tumor primario y metastásico observando gran concordancia para el estado mutacional del gen *KRAS*, mientras que existían diferencias muy significativas para los otros tres genes analizados (*NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*)²²⁵. Estas discrepancias no solo se han encontrado al comparar tumores primarios y sus metástasis hepáticas, sino también entre tumores primarios y metástasis ganglionares regionales²²⁶.

Más recientemente, estudios de secuenciación masiva sobre muestras pareadas de tumores primarios de CCR y sus metástasis, han corroborado el elevado grado de concordancia existente en el estado mutacional, de ambos tipos de muestras para la gran mayoría de los genes analizados, detectándose resultados discordantes únicamente para los genes *TP53*, *SMAD4* y/o *PTEN*, lo que subrayaría la importancia tanto de estos genes como de las vías de señalización que controlan, en el proceso metastásico^{214, 223}.

A nivel genómico, Takayama *et al.* describieron anomalías en los niveles de expresión de genes involucrados en procesos de angiogénesis, adhesión y migración celular, empleando arrays de alta densidad. Así, a modo de ejemplo, observaron una relación directa entre niveles elevados de expresión de *CEA* y de genes involucrados en los procesos de adhesión celular y angiogénesis, con el fenotipo metastásico (Tabla 5)²²⁷. Más recientemente, otros autores empleando arrays de alta densidad, han puesto de manifiesto también la existencia de alteraciones en los niveles de expresión de varios genes, entre el tejido intestinal normal y el tumor primario, así como entre tumores primarios y sus correspondientes metástasis hepáticas, mereciendo especial destaque los genes que afectan a la vía de señalización de TFG- β ²¹⁷.

Tabla 5. Genes con niveles de expresión alterados en tumores metastásicos de CCR (adaptado de Katayama *et al.*²²⁷)

PROCESO AFECTADO	EXPRESION	GEN ALTERADO	CARACTERISTICAS DEL GEN	REFERENCIAS
Proteólisis y digestión de la matriz extracelular	↑	<i>MMP-7</i>	Metaloproteasa de matriz extracelular (Matrilisina)	227, 228
	↑	<i>MMP-2,-9</i>	Metaloproteasa de matriz extracelular (Gelatinasa)	229-232
	↑	<i>MMP-1, -8, -13</i>	Metaloproteasa de matriz extracelular (Colagenasa)	227,228,229,230
	↓	<i>TIMP-1</i>	Inhibidor de MMP	227
	↑	<i>uPAR</i>	Receptor de uroquinasa activador del sistema plasmina-plasminógeno	227, 233-235
Adhesión celular	↑	<i>ICAM-1</i>	Molécula de adhesión intercelular de la superfamilia de las inmunoglobulinas (CD52)	227, 233-235
	↑	<i>VCAM-1</i>	Molécula de adhesión vascular de la superfamilia de las inmunoglobulinas	227, 233-235
	↓	<i>E-CADHERIN</i>	Molécula de adhesión tipo cadherina	227, 236
	↑	<i>CD44</i>	Receptor de ácido hialurónico	227, 237
	↑	<i>CEA</i>	Molécula de adhesión tipo glicoproteína	227, 238
Angiogénesis	↑	<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular	227, 239, 240
	↑	<i>PD-ECGF</i>	Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas	227, 241
Supervivencia celular	↑	<i>TRIAL-R</i>	Receptor de membrana para el ligando TRIAL	227, 242
Migración celular	↑	<i>CXCR4</i>	Receptor de quimiocinas de la familia CXC (CD184)	227, 243

▼: infra-expresión, ▲: sobre-expresión

2.2.5.2. Mecanismos moleculares involucrados en el proceso metastásico

En la actualidad está bien establecido que el inicio del proceso metastásico, requiere de neovascularización/angiogénesis a nivel del tumor primario con invasión del tejido normal adyacente, hasta que las células tumorales se separan del tumor primario, migran por vía sanguínea y/o linfática y colonizan otros órganos²⁴⁴⁻²⁴⁶. Una vez han pasado a la circulación sanguínea, estas células deben sobrevivir en la circulación sistémica, adherirse al endotelio vascular en el órgano diana, y extravasarse a dicho órgano, donde finalmente han de promover el establecimiento de una nueva red de vasos sanguíneos que proporcione el ambiente idóneo al desarrollo del tumor secundario, y la colonización del nuevo tejido²⁴⁴⁻²⁴⁶. En este proceso, las células metastásicas deben además evadir el control del sistema inmune.

Angiogénesis. El principal mecanismo desencadenante de angiogénesis es la hipoxia generada por la proliferación (masiva) de células metabólicamente activas en el tejido tumoral, y que hace que aumenten los requerimientos de oxígeno y elementos nutricionales a nivel local. En el CCR, la hipoxia conlleva la activación del factor inducible por hipoxia tipo 1 (HIF1), que a su vez desencadena un aumento de la producción de factores de crecimiento pro-angiogénicos como VEGF y/o PDGF, a nivel de la propia célula tumoral, en paralelo con una disminución de la expresión de diferentes genes anti-angiogénicos como el

gen de la trombospondina^{177, 244, 247}. Dado que la hipoxia afecta a todas las células del entorno tumoral, estos factores de crecimiento pro-angiogénicos son producidos a nivel local no solo por las células tumorales, sino también por células del estroma intestinal y células del sistema inmune que acompañan al tumor²⁴⁸, interaccionando con sus correspondientes receptores presentes en la membrana de las células endoteliales; esto desencadena la activación de diferentes vías de señalización, como las vías de señalización de PIK3/AKT y/o MAPK/ERK, con un efecto de vasodilatación y proliferación/migración de células endoteliales^{158, 183}, asociado a la creación de redes vasculares caóticas y poco funcionales debido al desequilibrio existente entre factores anti- y pro-angiogénicos²⁴⁷, lo cual facilita la diseminación de células tumorales con capacidad metastásica²⁴⁹.

De todas las moléculas involucradas en el proceso de angiogénesis, el receptor de VEGF tiene especial relevancia en el tratamiento del CCR, ya que disponemos de anticuerpos monoclonales anti-VEGF, (bevacizumab) que han demostrado un efecto beneficioso en pacientes con CRC avanzado con enfermedad a distancia, en los que el tratamiento con agentes citostáticos combinado con anticuerpos monoclonales anti-EGFR no ha sido eficaz o está contraindicado^{48, 49}; en este sentido, cabe señalar que bevacizumab ha demostrado ser igual de eficaz en el tratamiento del CCR con independencia del estado mutacional del gen *KRAS*²⁵⁰. Así mismo, VEGF-C se ha relacionado también con el proceso metastásico vía linfática^{46, 251}, ya que su unión al receptor de membrana VEGFR3 presente en las células endoteliales linfáticas, desencadena la activación de diferentes vías de señalización como NF-κB o MAPK/ERK, que promueven el desarrollo de nuevos vasos linfáticos y por consiguiente de metástasis^{252, 253}. En este contexto, Meijer *et al.* observaron que el aumento de expresión de CXCR5 en células tumorales, así como en células endoteliales del tejido linfático, constituye un mecanismo favorecedor de la colonización del hígado por parte de las células tumorales de CCR, al permitir la interacción directa de estas últimas con las células hepáticas que expresan su ligando BCA-1/CXCL13; con ello se favorece la invasión del hígado, tan frecuente en el CCR²⁵⁴.

Invasión del tejido normal adyacente: Interacción entre las células tumorales y las células del estroma

En los estadios iniciales del desarrollo tumoral, todos los componentes del estroma intestinal juegan un papel importante, debido a que las células tumorales poseen la capacidad de modificar la organización local

de las células que lo forman, y con ello, de la arquitectura del tejido^{255, 256} y del respectivo microambiente característico del estroma, confiriéndole características especiales que facilitan su interacción directa con las células tumorales²⁵⁷. Las principales modificaciones que se producen a nivel local incluyen: i) el aumento de la densidad de los capilares sanguíneos y del número de fibroblastos y ii) alteraciones en los perfiles de expresión génica de las células endoteliales, asociadas a un aumento de la producción local de citocinas y factores de crecimiento^{248, 256, 257}.

Dentro de los elementos celulares del estroma, los fibroblastos juegan un importante papel en la progresión del tumor²⁵⁸. En este sentido, se han identificado diferentes mutaciones genéticas con alteración en el fenotipo típico de los fibroblastos intestinales, que acaban por convertirse en fibroblastos asociados a cáncer (CAF)²⁵⁹. No obstante, seguimos sin conocer los mecanismos por los que los CAF promueven el proceso metastásico. Entre otros hallazgos, Zhu *et al.* han descrito la existencia de un aumento en los niveles de expresión de TGF- β , como uno de los principales causantes del desprendimiento de las células tumorales a nivel del tumor primario, así como un incremento en la expresión de TGF-1 que conllevaría un aumento en la expresión de la proteína PAI1 promotora de la invasión tumoral y la angiogénesis²⁶⁰.

A nivel local, la matriz extracelular constituye el principal componente del tejido intestinal, estando formada fundamentalmente por moléculas de colágeno, fibronectinas, glicanos, hialuronos, lamininas y proteoglicanos. Un desequilibrio en los niveles de estas moléculas causa disfunciones en las células intestinales, facilitando el desarrollo del tumor y viceversa²⁴⁴. Así, Zapatzka *et al.* han descrito la existencia de una relación directa entre la disminución de los niveles de moléculas integrantes de la matriz extracelular y las alteraciones en la vía de señalización de TGF- β , en la que la pérdida de función de *SMAD4* observada en pacientes con CCR, conlleva una disminución de la síntesis de laminina 5²⁶¹. Uno de los principales mecanismos por los que las células tumorales modifican la matriz extracelular radica en la interferencia con el metabolismo y la degradación de las moléculas que lo integran. En este sentido, se ha observado un aumento de la expresión de las metaloproteasas MMP2 y MMP9, que juegan un papel esencial en la progresión del tumor a nivel autocrino como paracrino^{230, 262}; además, Stenzinger *et al.* han

referido la existencia de una asociación entre el aumento de los niveles de ambas metaloproteasas y niveles elevados de la proteína EMMPRIN, cuya función radica precisamente en activar las primeras²⁴³. Así mismo, la interacción de moléculas de adhesión celular como las integrinas expresadas por las células tumorales con proteínas de la matriz extracelular y de células del estroma, responsables en condiciones fisiológicas de la unión de las células intestinales a la membrana basal, induce motilidad celular mediada por actina, asociándose con invasión local y fenotipos más agresivos de CCR²⁶³.

Transición epitelio-mesénquimal de las células tumorales. La transición epitelio-mesénquimal (EMT) representa un proceso biológico morfo-genético reversible, que implica la transición de células epiteliales polarizadas y estáticas, a células mesenquimales móviles y multipolares. Este proceso de EMT se cree tiene un papel esencial en la progresión del tumor y en la aparición de metástasis, al facilitar la separación de las células de la masa tumoral de origen y favorecer su migración a distancia²⁶⁴. En la Tabla 6 se describen brevemente las principales moléculas y factores de transcripción involucrados en la EMT, así como las diferentes características fenotípicas más habituales de las células epiteliales y mesenquimales²⁶⁵.

Tabla 6. Genes involucrados en el proceso de EMT en el CCR (Adaptado de Cao *et al*²⁶⁵).

	GEN	CARACTERISTICAS DEL GEN	SIGNIFICADO CLINICO (e.g. asociación)	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
FACTORES DE TRANSCRIPCION	SNAI1	Factor de transcripción de la familia Snail	Metástasis, pronóstico adverso	266
	SLUG	Factor de transcripción de la familia Snail	Metástasis, angiogénesis, pronóstico adverso	267
	ZEB1	Factor de transcripción tipo dedos de zinc	Metástasis, invasión local, pronóstico adverso	268
	ZEB2	Factor de transcripción tipo dedos de zinc	Progresión tumoral, pronóstico adverso	269
	AP4	Factor de transcripción de la familia bHLH	Metástasis hepática, pronóstico adverso	270
	TWIST1	Factor de transcripción de la familia bHLH	Metástasis linfática, pronóstico adverso	271
	FOXC1	Factor de transcripción de la familia Forkhead	Metástasis linfática	272
	SOX2	Factor de transcripción tipo caja HMG	Metástasis linfática y hepática	273
	OCT4	Factor de transcripción tipo Homebox	Metástasis hepática	274
	PROX1	Factor de transcripción tipo Homebox	Metástasis linfática, estadios avanzados	275
CO-REGULADORES DE TRANSCRIPCION	FHL2	Proteína de membrana co-reguladora de SNAI1	Invasión, metástasis	276
	BRG1	Regulador de transcripción mediada por ZEB1	Metástasis, invasión local, pronóstico adverso	277
	P21	Regulador del ciclo celular a través de ZEB	Metástasis, invasión local, pronóstico adverso	278

De todos los genes y moléculas involucradas en la EMT en el CCR, la E-cadherina constituye la principal responsable de la adhesión de las células epiteliales intestinales²⁷⁹. La pérdida de funcionalidad de esta molécula, ya sea por mutación genética, por aumento de su degradación, por un incremento en el proceso de internalización de la molécula o bien por la desorganización de las conexiones formadas entre ella y la β -catenina con la activación de la vía de señalización WNT/ β -catenina, promueve la migración de las células tumorales y su capacidad de invasión local del estroma^{265, 280}. Yun *et al.* han relacionado la existencia de niveles bajos de E-cadherina con estadios avanzados de la enfermedad (estadio III), y tasas de SG significativamente acortadas²⁸¹. Así mismo, se ha constatado la sustitución de E-cadherina por N-cadherina en las células de CCR, con consecuencias funcionales idénticas a las descritas anteriormente para la pérdida de función de la E-cadherina²⁸².

Otra de las moléculas implicadas en la EMT es TGF- β , que puede actuar tanto a nivel autocrino como paracrino. Así, la activación de la vía de señalización de TGF- β tiene como consecuencia el aumento de la actividad del gen *HMGA2* que activa los factores de transcripción Slug, Snail-1, Snail-2 y Twist, principales inductores de la EMT^{265, 280, 282}. En este contexto, cabe señalar que 37% de los CCR presentan alteraciones en SLUG, existiendo una asociación directa entre estas y estadios más avanzados de la enfermedad, un pronóstico más adverso y bajas tasas de SG²⁵⁰. Además, la detección de niveles elevados de TWIST se considera como uno de los indicadores de la existencia de metástasis ganglionares regionales y de metástasis a distancia²⁵⁰, apoyando el papel clave de la EMT tanto en el inicio como en el mantenimiento del tumor¹⁷¹.



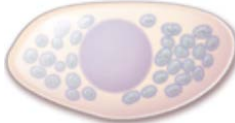
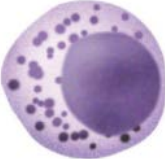
Intravasación y circulación de células tumorales en los vasos sanguíneos y linfáticos. Todos los procesos hasta ahora descritos contribuyen al desprendimiento de las células del CCR y a su paso al interior de los vasos sanguíneos (intravasación). La vía más prevalente de diseminación de las células tumorales en el CCR es el sistema porta-hepático y los vasos sanguíneos de su vecindad. La intravasación lleva asociada fibrinólisis, implicando al activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), y al resto de componentes del sistema fibrinolítico ya sean los elementos pro-fibrinolíticos o sus inhibidores²⁸³; la unión de uPA con su receptor a nivel celular conlleva la activación del plasminógeno y de otras proteasas (MMP2 y MMP9) que

promueven la digestión de la matriz extracelular y facilitan el desprendimiento de células tumorales^{230, 262}. Kwaan *et al.* describieron en detalle la implicación de este sistema en múltiples rutas celulares incluyendo la adhesión, quimiotaxis y liberación de citocinas, aspectos que en común, promueven de forma activa la progresión tumoral²⁸⁴.

Una vez las células tumorales están, en el interior de los vasos (sanguíneos o linfáticos), éstas pierden el contacto con la matriz extracelular, lo que en condiciones normales desencadena la puesta en marcha de la muerte celular por apoptosis debido principalmente a la pérdida de las uniones mediadas por integrinas²⁸⁵. Diferentes estudios han demostrado que esto ocurriría también en las células tumorales, de tal forma que solo una pequeña proporción de ellas (0,01%) serán finalmente capaces de salir de la circulación y metastatizar²⁸⁶, mientras que la mayor parte mueren en el torrente circulatorio o linfático debido a las fuerzas mecánicas características de ambas circulaciones²⁸⁶. Otro factor que facilita la muerte de las células tumorales circulantes es la ausencia de capacidad para adaptación morfológica de las mismas, ya que deberán modificar su forma esférica, y adquirir una morfología cilíndrica para poder resistir la contractilidad a la que están sometidas en el interior de los vasos. Las células más agresivas y con mayor poder de invasión serán finalmente aquellas que presenten mayor capacidad de experimentar una (gran) deformación morfológica²⁸⁷.

Extravasación e invasión del tejido hepático por las células tumorales. La última etapa del proceso metastásico radica en la capacidad de invadir el tejido hepático por parte de las células tumorales. Se trata de un proceso complejo en el que se diferencian dos fases bien definidas: i) fase de infiltración microvascular por parte de las células tumorales, y ii) fase de establecimiento de la metástasis hepática^{244, 288}. La primera fase constituye el punto clave para el establecimiento y consolidación de las células tumorales en el tejido; a diferencia de las etapas posteriores, que ocurren en el interior del parénquima hepático, ésta primera fase tiene lugar en los sinusoides hepáticos donde existen cuatro poblaciones celulares que interaccionan con las células tumorales facilitando su extravasación y adhesión al parénquima hepático (Tabla 7)^{244, 288}.

Tabla 7. Poblaciones celulares presentes en el espacio sinusoidal hepático implicadas en el proceso de extravasación e invasión tisular en la metástasis hepática del CCR.

	POBLACION CELULAR	FUNCION BIOLOGICA	ACCION EN EL PROCESO DE METASTASIS
	Célula endotelial sinusoidal hepática	Transporte e intercambio de fluidos, solutos y partículas entre el espacio de Disse y la sangre sinusoidal	Inmunomoduladora (célula presentadora de antígenos solubles) Producción de especies reactivas de oxígeno como el óxido nítrico (NO)
	Célula de Kupffer	Macrófagos tisulares con función fagocítica	Inmunomoduladora (célula presentadora de antígeno y fagocítica efectora)
	Célula Estrellada	Regeneración tisular mediante secreción de proteínas de la matriz extracelular Promoción de la diferenciación celular	Inmunomoduladora (célula presentadora de antígenos solubles y secretora de citocinas proinflamatorias) Secreción de factores de crecimiento (VEGF)
	Célula de Pit	Citotoxicidad mediada por la liberación de enzimas (perforina y granzima)	Inmunomoduladora (secreción de citocinas proinflamatorias) Inductora de apoptosis de células tumorales al expresar el ligando de FasL (CD95L)

En la segunda fase de establecimiento de la metástasis a nivel hepático las células tumorales del CCR colonizan el hígado, en tres estadios: establecimiento de micro-metástasis interlobulares, inducción de angiogénesis y desarrollo de macro-metástasis hepáticas.

El microambiente hepático es muy diferente del microambiente tisular del intestino desde donde han emigrado las células tumorales, y suele ser incompatible con su supervivencia. No obstante, diferentes estudios han puesto de manifiesto que las células tumorales son capaces de adaptarse a las condiciones adversas del medio y de generar un nicho pre-metastásico donde asientan y desde el que liberan CD44 y/o factores de crecimiento tipo EGF y TNF- α que estimulan y aumentan su capacidad proliferativa en el nuevo tejido²⁸⁹⁻²⁹¹. Además, las células tumorales para sobrevivir en el tejido hepático sufren un cambio inverso al ocurrido en las etapas iniciales del proceso metastásico, de tal forma que las células tumorales con características morfológicas y funcionales de célula mesenquimal se transforman ahora de nuevo en células

epiteliales (MET), incrementando así la expresión de las mismas moléculas de adhesión que expresaban en el tejido primario, como por ejemplo la E-cadherina^{279, 291}. La capacidad de las células tumorales de realizar MET representa una de las características más típicas de las células tumorales con potencial metastásico. No obstante todo lo anterior, de todas las células que migran hacia la circulación sanguínea solo unas pocas logran invadir el tejido hepático originando micro-metástasis y dando posteriormente lugar a las macro-metástasis que invaden regiones significativas del tejido hepático. En este contexto, cabe señalar que el fenotipo de las células tumorales metastásicas difiere del de la célula CCR original, ya que ha de adaptarse, tanto desde el punto de vista funcional como morfológico, al nuevo microambiente tisular que ha invadido^{227, 249, 292}.

2.2.6. Técnicas de análisis genómico

Los estudios genéticos y genómicos han sido clave en las últimas décadas para identificar y caracterizar las alteraciones genéticas implicadas en la génesis y progresión del CCR, 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 en los que se ha perseguido la caracterización genética del CCR emplearon técnicas de citogenética convencional (CC) basadas en el estudio del cariotipo de las células tumorales^{95, 102}. Estos estudios arrojaron luz sobre las principales alteraciones cromosómicas características de estos tumores, permitiendo así identificar tanto alteraciones primarias asociadas al desarrollo de la enfermedad, como anomalías secundarias relacionadas con la progresión de la misma; con ello proporcionaron los primeros datos sobre posibles patrones de evolución clonal a nivel intra- e inter-tumoral en el CCR^{195, 209}. No obstante, la CC, aunque permite obtener una visión global de las alteraciones citogenéticas presentes en la célula tumoral, constituye un método poco sensible debido a la necesidad de obtener metafases (solo proporciona información sobre células tumorales que se hayan dividido *in vitro*)¹¹¹, con la posibilidad de que ocurra una selección clonal en cultivo; además, la CC únicamente permite identificar alteraciones en las que se ven implicadas secuencias extensas de ADN incluidas en la región cromosómica alterada. Por ello, la técnica de *i*FISH se ha convertido en una aproximación complementaria

y a la vez alternativa, muy empleada para la caracterización genética del tumor, debido a que permite realizar estudios genéticos dirigidos sin necesidad de cultivo *in vitro* y en ausencia de metafases; gracias al uso de diferentes fluorocromos, la *iFISH* permite además la detección simultánea de varias alteraciones genéticas presentes en células tumorales individuales. Por el contrario, la técnica de *iFISH* solo informa sobre el estado de regiones cromosómicas frente a las cuales se han empleado sondas específicas y no permite obtener una información global sobre genoma de células tumorales²⁹³⁻²⁹⁵.

Una variante más reciente de la *iFISH* es la hibridación genómica comparada (CGH), basada en la hibridación competitiva de 2 moléculas de ADN (el ADN control o de referencia y el ADN tumoral) cada una de ellas marcada con un fluorocromo diferente; basado en el predominio de alguno de los dos fluorocromos, se identifican de forma global las pérdidas y/o ganancias de secuencias más o menos extensas de ADN presentes en el genoma tumoral. La principal ventaja de la CGH radica en que al igual que la *iFISH* no requiere de células en división, pero a diferencia de ella, aporta información sobre las ganancias y pérdidas cromosómicas existentes a lo largo de todo el genoma. Sin embargo la CGH, no detecta reordenamientos, inversiones y otras alteraciones cromosómicas estructurales de tipo balanceado, es decir, en las que no existen pérdidas y/o ganancias de secuencias de ADN relativamente importantes; además, la CGH presenta una sensibilidad relativamente limitada al requerir un grado de infiltración tumoral relativamente elevado (>30%)²⁹⁶⁻²⁹⁸.

Más recientemente, con el desarrollo de los arrays de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), en los que se combina la técnica de CGH con el genotipado masivo de SNPs sobre una misma plataforma, facilitando así el análisis simultáneo del número de copias de ADN y del genotipo, con gran resolución; además, esta aproximación permite detectar regiones cromosómicas que han sufrido LOH. No obstante lo anterior, los arrays de SNPs también presentan algunos inconvenientes al requerir de un equipamiento relativamente caro y sobre todo al no permitir detectar alteraciones estructurales como traslocaciones, y requerir de una infiltración tumoral de al menos el 20% de la celularidad global de la muestra²⁹⁶⁻²⁹⁸.

Los avances tecnológicos ocurridos en las últimas décadas en el campo de la secuenciación del DNA han dado como fruto también el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación

(NGS), que permiten realizar la secuenciación del genoma completo, del exoma completo y de paneles más o menos amplios de genes²⁹⁹. En este sentido, en los últimos años se han desarrollado paneles de genes para NGS centrados en el análisis de genes involucrados en el CCR y en la respuesta al tratamiento y que entre otros incluyen los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*^{121, 223}. De forma similar, *Tops et al.* han desarrollado un panel de 30 genes enfocados al diagnóstico y estratificación pronóstica del CCR³⁰⁰. Todo ello se ha traducido en el desarrollo de kits comercializados por empresas como *Illumina* y *Life Technologies* para el análisis de diferentes paneles de genes involucrados en el CCR mediante NGS, lo cual ha estimulado y potenciado la identificación de mutaciones en dichos genes, y facilitado el análisis de su posible utilidad clínica en pacientes con CCR^{121, 299, 301, 302}. En la Tabla 8 se recogen de forma resumida las principales ventajas y limitaciones de las distintas técnicas de análisis genético descritas.

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

TECNICA	VENTAJAS	LIMITACIONES
Citogenética convencional	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
FISH	Detección simultánea de varias alteraciones genéticas Detección de alteraciones estructurales como traslocaciones e inversiones	No aporta información global del genoma Resolución limitada
Arrays de CGH	Información global del genoma Detección de ganancias y pérdidas cromosómicas Elevada resolución (<1Mb)	Sensibilidad limitada (>30% de células tumorales) No detecta alteraciones estructurales Equipamiento complejo
Arrays de SNPs	Información global del genoma Detección de ganancias y pérdidas cromosómicas Detección de LOH Elevada resolución (<2.5Kb)	Sensibilidad limitada (>20% de células tumorales) No detecta alteraciones estructurales Equipamiento de coste elevado
NGS	Elevada sensibilidad Posibilidad de análisis simultaneo de múltiples genes y de secuenciación completa del genoma	Coste elevado Equipamiento complejo y de coste elevado Técnica laboriosa Análisis bioinformático complejo

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El 25% de los pacientes diagnosticados de CRC esporádico (sCRC) presentan metástasis en el momento del diagnóstico, siendo el hígado el órgano más frecuentemente afectado. Este grupo de pacientes se caracteriza por presentar un pronóstico adverso y requiere de tratamientos habitualmente agresivos que incluyen la cirugía y tratamiento farmacológico complementario (fármacos citostáticos, anti-metabolitos y/o anticuerpos monoclonales).

Desde 1990, cuando Fearon y Vogelstein propusieron el modelo de carcinogénesis del sCRC, se han logrado importantes avances en la identificación de las alteraciones genéticas implicadas en este proceso así como en el conocimiento de las rutas de señalización intracelular implicadas en las mismas. Sin embargo, falta aún por esclarecer cuáles son las alteraciones genéticas involucradas en el proceso de metástasis, que confieren a las células tumorales mayor agresividad y capacidad para colonizar tejidos con un microambiente muy diferente al del epitelio intestinal.

Nuestro grupo de investigación trabaja desde hace años en la identificación de las alteraciones genéticas involucradas en el proceso metastásico del sCRC, analizando de forma paralela muestras de tumores primarios de colon y sus correspondiente metástasis hepáticas. Estos estudios nos han permitido identificar alteraciones cromosómicas que están asociadas a fenotipos más agresivos de las células tumorales presentes tanto en los tumores primarios como en las metástasis, y que podrían estar relacionados con una mayor capacidad de invasión del tejido hepático. Además, estos resultados muestran la coexistencia de varios clones tanto en el tumor primario como en sus metástasis, permitiendo así establecer diferentes vías de evolución clonal a nivel intra-tumoral que demuestran que las lesiones metastásicas probablemente derivan de un clon de células tumorales presente ya en el tumor colorrectal primario. A pesar de todos estos avances alcanzados en el conocimiento de las alteraciones genómicas implicadas en el proceso metastásico, en la actualidad aún no se ha podido definir con precisión el perfil genético específico del sCRC metastásico; esto permitiría identificar y discriminar, ya en el momento del diagnóstico, entre pacientes cuyos tumores tienen potencial metastásico y casos no metastásicos, con las correspondientes implicaciones pronósticas y terapéuticas. Además, la identificación de un perfil de

alteraciones genómicas asociadas al proceso metastásico permitiría también profundizar en el conocimiento biológico de la enfermedad, al facilitar el esclarecimiento de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de diseminación tumoral, y proporcionar información clave para la estratificación pronóstica de los pacientes y su tratamiento, así como para un adecuado seguimiento y control de la enfermedad.

Dentro de los pacientes con sCRC, aquellos que son diagnosticados de adenocarcinomas de recto localmente avanzado reciben en la actualidad una atención clínica específica, caracterizada por la administración de radio-quimioterapia pre-operatoria (RQT); con esta estrategia se consigue una mejoría notable en la calidad de vida de los pacientes ya que permite la conservación de esfínteres asociada a una menor tasa de recidiva. No obstante, la respuesta a la RQT es muy variable, desconociéndose en la actualidad las alteraciones genéticas que pudieran estar implicadas en la resistencia al tratamiento administrado y la posterior diseminación de la enfermedad. La identificación de estas alteraciones, así como de los diferentes clones de células tumorales que puedan llegar a coexistir a nivel intra-tumoral, permitiría identificar también de forma temprana aquellos pacientes que serían sensibles o resistentes a la RQT, contribuyendo así a un abordaje terapéutico personalizado para cada caso concreto y a incrementar la probabilidad de identificar pacientes cuyos tumores presenten mayor capacidad invasiva con los protocolos terapéuticos actuales.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo doctoral nos hemos planteado como **objetivo general** identificar perfiles de alteraciones genómicas característicos del sCRC, y en especial de los tumores metastásicos, analizando además su posible valor predictivo de la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el adenocarcinoma rectal localmente avanzado.

Para ello nos hemos propuesto tres objetivos específicos:

- Determinar las alteraciones cromosómicas de tipo numérico y estructural más frecuentes en los tumores primarios de pacientes con sCRC metastásico, y que condicionan el pronóstico de la enfermedad.

- Identificar perfiles genéticos típicos del sCRC metastásico que permitan profundizar en el conocimiento de las alteraciones genéticas responsables de este proceso y de su posible asociación con el pronóstico de la enfermedad.
- Definir las alteraciones genéticas y las vías de evolución clonal presentes a nivel intra-tumoral que estén asociadas con la respuesta al tratamiento neoadyuvante en pacientes con cáncer localmente avanzado.

**MATERIALES,
MÉTODOS Y
RESULTADOS**

En esta sección de la memoria se describen las muestras, pacientes, materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos en el presente trabajo doctoral, mediante la inclusión de los artículos originales publicados, directamente relacionados con el mismo. Cada uno de los artículos está precedido de un resumen redactado en castellano para facilitar una revisión rápida de la información contenida en los mismos.

**Impacto pronóstico en el carcinoma colorrectal
esporádico de las del(17p) y del(22q) analizadas
mediante hibridación *in situ* fluorescente**

1

María González-González¹, Luis Muñoz-Bellvis², Carlos Mackintosh³, Celia Fontanillo⁴, M. Laura Gutiérrez¹, M. Mar Abad⁵, Oscar Bengoechea⁵, Cristina Teodosio¹, Emilio Fonseca⁶, Manuel Fuentes¹, Javier De Las Rivas⁴, Alberto Orfao^{1*}, José María Sayagués^{1*}

1 Servicio General de Citometría, Departamento de Medicina y Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Universidad de Salamanca

2 Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática, Departamento de Cirugía, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

3 Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca

4 Grupo de Investigación en Bioinformática y Genómica Funcional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca

5 Departamento de Patología, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

6 Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

PLoS One. 2012;7(8):e42683.

doi: 10.1371/journal.pone.0042683.

Introducción. La diseminación metastásica del tumor primario es la principal causa de muerte de pacientes con cáncer colorrectal esporádico (sCRC). La metástasis es un proceso complejo asociado a la acumulación secuencial de múltiples alteraciones genéticas y moleculares y de anomalías y/o cambios epigenéticos que involucran a uno o múltiples clones de células tumorales. En los últimos años, los estudios basados en la identificación de las vías de evolución clonal a nivel intra-tumoral indican que, en el sCRC las metástasis hepáticas pueden derivar de un clon de células tumorales que ya está presente en el tumor primario, caracterizado por presentar habitualmente ganancias de las regiones cromosómicas 8q, 13q y 20q, y pérdidas a nivel de 1p, 8p, 17p, 18q y 22q. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito la presencia en la mayoría de los tumores primarios de pacientes con sCRC metastásico de un punto de ruptura en la región cromosómica 17p11.2 (20.156.497pb y 22.975.771pb) asociada además con un pronóstico adverso.

Objetivo. El objetivo de este trabajo se centró en analizar el valor pronóstico de las anomalías numéricas y estructurales que afectan a los cromosomas más frecuentemente alterados en pacientes con sCRC metastásico vs. sCRC no metastásico, incluyendo el análisis en ambos grupos de pacientes de la prevalencia del punto de ruptura localizado a nivel de la región 17p11.2.

Pacientes, materiales y métodos. En conjunto, analizamos (prospectivamente) 58 tumores primarios de pacientes diagnosticados de sCRC con una mediana de seguimiento (en el momento de cerrar el estudio) de 96 meses (12-124 meses). De los 58 casos analizados, 27 (47%) tumores presentaban metástasis hepáticas sincrónicas y 31 (53%) pacientes correspondieron a sCRC no metastásicos. Para el estudio de las alteraciones cromosómicas empleamos 18 sondas específicas para las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas en el sCRC (1p, 1q, 7p, 7q, 8p, 8q, 13q, 14q, 17p, 17q, 18q, 20q, 22q) y una sonda específica del punto de ruptura localizado en la región cromosómica 17p11.2. Para determinar el impacto funcional de las alteraciones de los genes codificados en las regiones cromosómicas que presentaban alguna alteración empleamos el programa informático Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity SystemH, www.ingenuity.com). Así mismo analizamos el impacto de dichas alteraciones en el pronóstico de la enfermedad, validando (en un segundo paso) los resultados encontrados en nuestra serie de pacientes, en

una serie externa de 109 sujetos con sCRC, en la que se habían investigado las alteraciones cromosómicas presentes en el tumor mediante técnicas de aCGH (base de datos GEO; código de acceso GSE12520). Para evaluar el significado estadístico de las diferencias observadas entre grupos, empleamos las pruebas de la T de Student y de la U de Mann-Whitney para variables continuas, según presentasen o no una distribución normal, respectivamente; para variables cualitativas, se aplicó la prueba de la χ^2 . Con el fin de determinar el valor pronóstico de las diferentes alteraciones cromosómicas sobre la supervivencia global (SG) elaboramos curvas de supervivencia con el método de Kaplan y Meier, y empleamos el test log-rank para establecer la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre dichas curvas. Para el análisis multivariante de factores pronósticos para la SG empleamos el método de la regresión logística de Cox. La existencia de diferencias estadísticamente significativas se estableció cuando los valores de p eran $\leq 0,05$.

Resultados. En términos generales, nuestros resultados mostraron la existencia de perfiles citogenéticos similares entre los tumores no metastásicos y metastásicos; las únicas alteraciones genéticas presentes en distinta frecuencia en ambos grupos de tumores, correspondieron a alteraciones de las regiones cromosómicas 17p ($p=0,001$) y 22q ($p=0,02$). Así, todos los casos con del(22q) correspondían a tumores metastásicos mientras que la del(17p13) estaba presente en el 74% de los tumores metastásicos vs. 19% de los sCRC no metastásicos. Además, la del (17p13) con punto de ruptura a nivel de la región 17p11.2 se detectó de forma casi exclusiva entre los tumores metastásicos. La mayoría de los casos con del(22q) ($n=5$) también mostraron del(17p11.2), mientras que existían 16 casos con del(17p11.2) que no presentaban del(22q). En las regiones cromosómicas 17p11.2, 17p13.1 y 22q11.2, están codificados un total de 36 genes, de los cuales 11 están relacionados con vías de señalización asociadas a cáncer, incluyendo los genes *EGFR*, *BCL2*, *BAX* y *TP53*, implicados en el origen y progresión del sCRC. Al analizar el impacto de las alteraciones cromosómicas detectadas sobre la SG de los pacientes con sCRC, encontramos que la presencia de del(17p13) ($p=0,04$), del(17p11.2) ($p=0,001$) y del(22q11) ($p=0,001$) se asociaba con un pronóstico adverso, constituyendo estas tres anomalías la mejor combinación de parámetros genéticos para la estratificación pronóstica de pacientes con sCRC de acuerdo a su SG. Así, en base a estos resultados,

construimos un sistema de puntuación que permitía estratificar a los pacientes con sCRC de acuerdo a su pronóstico en: pacientes de bajo riesgo (sin características adversas; puntuación 0), de riesgo intermedio (aquellos que presentaban una característica adversa y puntuación 1) y de alto riesgo (dos características adversas; puntuación 2). Los tres grupos de riesgo se asociaban a un pronóstico significativamente diferente ($p=0,001$) en lo que a la tasa de SG a los 5 años se refiere (92%, 53% y 0%, respectivamente). La validación del impacto clínico de la del(17p11.2) y de la del(22q) en una serie independiente de pacientes con sCRC, confirmó el valor pronóstico adverso de la del(17p11.2) ($p=0,01$), mientras que no permitió confirmar el impacto pronóstico negativo sobre la SG de este grupo de pacientes de la del(22q).

Conclusiones. Nuestros resultados demuestran que la presencia de del(17p) con punto ruptura a nivel de la región cromosómica 17p11.2 constituye un factor pronóstico adverso independiente en el sCRC asociándose dentro de estos pacientes a tumores metastásicos. Además, su combinación con la presencia de del(22q11.2), asociada también a sCRC metastásico, permite establecer tres grupos de riesgo de pacientes con sCRC con diferente SG.

Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as Assessed by Interphase FISH in Sporadic Colorectal Carcinomas

María González-González¹, Luís Muñoz-Bellvis², Carlos Mackintosh³, Celia Fontanillo⁴, M. Laura Gutiérrez¹, M. Mar Abad⁵, Oscar Bengoechea⁵, Cristina Teodosio¹, Emilio Fonseca⁶, Manuel Fuentes¹, Javier De Las Rivas⁴, Alberto Orfao^{1*†}, José María Sayagués^{1*†}

1 Servicio General de Citometría, Departamento de Medicina and Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **2** Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática, Departamento de Cirugía, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Salamanca, Spain, **3** Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **4** Grupo de Investigación en Bioinformática y Genómica Funcional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **5** Departamento de Patología, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Salamanca, Spain, **6** Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Salamanca, Spain

Abstract

Background: Most sporadic colorectal cancer (sCRC) deaths are caused by metastatic dissemination of the primary tumor. New advances in genetic profiling of sCRC suggest that the primary tumor may contain a cell population with metastatic potential. Here we compare the cytogenetic profile of primary tumors from liver metastatic versus non-metastatic sCRC.

Methodology/Principal Findings: We prospectively analyzed the frequency of numerical/structural abnormalities of chromosomes 1, 7, 8, 13, 14, 17, 18, 20, and 22 by iFISH in 58 sCRC patients: thirty-one non-metastatic (54%) vs. 27 metastatic (46%) disease. From a total of 18 probes, significant differences emerged only for the 17p11.2 and 22q11.2 chromosomal regions. Patients with liver metastatic sCRC showed an increased frequency of del(17p11.2) (10% vs. 67%; $p < .001$) and del(22q11.2) (0% vs. 22%; $p = .02$) versus non-metastatic cases. Multivariate analysis of prognostic factors for overall survival (OS) showed that the only clinical and cytogenetic parameters that had an independent adverse impact on patient outcome were the presence of del(17p) with a 17p11.2 breakpoint and del(22q11.2). Based on these two cytogenetic variables, patients were classified into three groups: low- (no adverse features), intermediate- (one adverse feature) and high-risk (two adverse features)- with significantly different OS rates at 5-years ($p < .001$): 92%, 53% and 0%, respectively.

Conclusions/Significance: Our results unravel the potential implication of del(17p11.2) in sCRC patients with liver metastasis as this cytogenetic alteration appears to be intrinsically related to an increased metastatic potential and a poor outcome, providing additional prognostic information to that associated with other cytogenetic alterations such as del(22q11.2). Additional prospective studies in larger series of patients would be required to confirm the clinical utility of the new prognostic markers identified.

Citation: González-González M, Muñoz-Bellvis L, Mackintosh C, Fontanillo C, Gutiérrez ML, et al. (2012) Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as Assessed by Interphase FISH in Sporadic Colorectal Carcinomas. PLoS ONE 7(8): e42683. doi:10.1371/journal.pone.0042683

Editor: Hassan Ashktorab, Howard University, United States of America

Received: December 22, 2011; **Accepted:** July 11, 2012; **Published:** August 17, 2012

Copyright: © 2012 González-González et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work has been partially supported by grants from the Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain (SAN673/SA39/08 and SAN/103/2011), Fundación Memoria de Don Samuel Solórzano Barruso, Salamanca, Spain, Caja de Burgos (Obra Social), Burgos, Spain, Grupo Excelencia de Castilla y León (GR37) and the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain (PI12/02053-FIS and RD06/0020/0035-FEDER). JM Sayagués and M González are supported by grants (CP05/00321 and FI08/00721, respectively) from the ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain.

Competing Interests: The authors have the following competing interests: The study was partly funded by Caja de Burgos - Obra Social. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: orfao@usal.es (AO); ppmari@usal.es (JMS)

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Metastatic dissemination of the primary tumor is the major cause of death of sporadic colorectal cancer (sCRC) patients [1]. Metastasis is a complex multi-step process which is driven by sequential accumulation of multiple genetic and molecular alterations and/or epigenetic changes involving one or multiple tumor cell clones. In recent years, data accumulated about the intratumoral pathways of clonal evolution of sCRC associated with chromosomal alterations/instability, indicates that liver metastatic

lesions may derive from descendants of a tumor cell clone which is already present in the primary tumor [2]. Advances in genetic profiling of cancer also suggest that the metastatic potential of human tumors is encoded in the bulk of a primary tumor, as metastatic tumors systematically contain those genetic abnormalities observed in the primary tumor sample from the same subject. However, the precise molecular changes associated with the development of sCRC with liver metastasis still remain to be identified [2]. Multiple recurrent chromosomal abnormalities that are found in primary tumours have been associated with

metastatic CRC, including gains of chromosomes 8q, 13q and 20q and losses of the 1p, 8p, 17p, 18q and 22q chromosomal regions [3–5].

In a recent study, we described a detailed map of the genetic abnormalities of primary tumors from sCRC patients with liver metastasis by high-resolution SNP arrays. In this study, we reported the existence of a highly prevalent breakpoint region in the great majority of primary sCRC patients who had synchronous liver metastasis. Such breakpoint region is located in the centromeric region of chromosome 17p, between the genome coordinates 20,156,497 bp and 22,975,771 bp [6]. This breakpoint region has been previously associated with i) a homogeneous genetic profile consisting of a higher frequency of abnormalities of chromosomes 1p, 7, 8, 13q, 17p, 18q, 20q and 22q and ii) an adverse clinical outcome [7]. However, delineation of the minimal common breakpoint region at chromosome 17p11.2 and its potential prognostic value in sCRC tumors, remain to be fully defined.

In the present study we investigated the prognostic value of structural/numerical abnormalities of the most frequently altered chromosomes in liver metastatic colorectal carcinomas from 58 sCRC patients (27 liver metastatic *vs.* 31 non-metastatic tumors) with a long median follow-up, as detected by interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH). Overall, our results show that the occurrence of del(17p) involving the 17p11.2 breakpoint region is an independent prognostic factor for overall survival, as confirmed in a larger series of 119 patients from the GEO public database. However, we have demonstrated that the combined assessment of del(22q11) and del(17p11.2) increased the predictive value for a liver metastatic tumor.

Materials and Methods

Patients and samples

In the present study, we prospectively analyzed surgical specimens from 58 patients diagnosed with a sCRC between 1999 and 2010 (38 males and 20 females; median age of 69 years, ranging from 38 to 83 years) after informed consent was given by each subject. All patients underwent surgical resection of primary tumor tissues at the Department of Surgery of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain) and they were diagnosed and classified according to the WHO criteria [8] prior to any treatment was given. Fourteen primary tumors were localized in the rectum and the other 44 were localized either in the right (caecum, ascending or trasverse) or the left (descending and sigmoid) colon, with an overall mean size of 5.3±2 cm. According to tumor grade, 39 cases were classified as well-differentiated tumors, 15 as moderately- and four as poorly-differentiated carcinomas. In all cases, histopathological grade was confirmed in a second independent evaluation by an experienced pathologist. Median follow-up at the moment of closing this study was of 96 months (range: 12–124 months). The study was approved by the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain) and informed consent was given by each individual, prior to entering the study.

From the 58 cases analyzed, 27 (47%) tumors had liver metastases (group 1; median follow-up of 37 months; pT3–4 pN1–2 M1) identified either at time of colorectal surgery (n=16) or during the first year after initial diagnosis (n=11); they all underwent complete surgical resection of both their primary and metastatic CRC. The other 31 (53%) patients corresponded to non-metastatic sCRC selected on the basis of a long follow-up in the absence of liver metastasis (median follow-up of 99 months; pT2–4 pN0 M0) to ensure their non-metastatic nature (group 2).

After histopathological diagnosis was established, part of the primary tumor was used to prepare single-cell suspensions. Once prepared, single cell suspensions were resuspended in methanol/acetic (3/1; vol/vol) and stored at –20°C for further iFISH analyses, as described elsewhere [2]. The remaining tissue was either fixed in formalin and embedded in paraffin, or frozen in liquid nitrogen and stored at room temperature (RT) and at –80°C, respectively. Each individual tissue sample was also evaluated after haematoxylin-eosin staining, to confirm the presence of tumor cells and to evaluate their quantity.

Interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) studies

Mixed single-cell suspensions from different samples obtained from each tumor were used for iFISH studies, after fixation in 3/1 methanol/acetic (vol/vol). A set of 18 different probes (Vysis Inc, Downers Grove, IL) specific for those chromosomes and chromosomal regions most frequently gained/amplified and deleted colorectal carcinomas with liver metastases [6], were systematically used in double and triple staining with the Spectrum Orange (SO), Spectrum Green (SG) and Spectrum Aqua (SA) fluorochromes: for chromosome 1, the LSI p58 (1p36) (SO)/TelVysion 1p (SG)/LSI 1q25 (SA) Multi-color probe was employed; for chromosome 7, the LSI D7S486 (7q31) (SO)/CEP 7 (SG) Dual Color probe was used; for chromosome 8, the LSI LPL (8p22) (SO)/CEP 8 (SA)/MYC (8q24) (SG) Multi-color probe was employed; for chromosome 13, the LSI RB1 13q14 (SO)/LSI 13q34 LAMP1 (SG) was used; for chromosome 14, the LSI IGH (14q32.33) Dual Color, Break Apart probe was selected; for chromosome 17, the LSI TP53 (17p13) (SO)/CEP 17 (SA) probe combination was employed; for chromosome 18, the LSI BCL2 (18q21) (SO)/CEP 18 (SA) probe combination was used; for chromosome 20, the LSI ZNF217 (20q13.2) (SO)/CEP 20 (SG) probes were employed, and; for chromosome 22, the LSI BCR (22q11.2) probe was used. We have previously found in primary tumors [6] and their paired liver metastases [9] a high prevalence of gains of chromosomes 7, 8q, 11q, 13q, 20q and X together with losses of the 1p, 8p, 17p and 18q chromosomal regions; in this series of cases, the breakpoints found at the centromeric region of chromosome 17p were variable and were mapped between the genomic coordinates 20,156,497 bp and 22,975,771 bp by SNP's arrays. Herein, we investigated the presence of breakpoints at chromosome 17p11.2 using iFISH probes specifically designed and manufactured for this purpose (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands), as schematically described in Figure 1.

The specific methods and procedures used for the iFISH studies have been previously described in detail [2] and for the investigation of the relationships existing between those genes coded at the 17p11.2, 17p13.1 and 22q11.2 chromosomal regions and other genes, the Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuit System®, www.ingenuity.com) was used.

External validation of the prognostic impact of del(17p) and del(22q)

External validation of the prognostic impact of del(17p) and del(22q) was performed in a previously reported group of sCRC patients from which aCGH files (MHP Human 1 Mb) and clinical data were publicly available at the GEO database (accession number GSE12520; genomic markers that predict survivorship in colorectal cancer) [10]. From all cases available in the dataset, we selected those studied with the MHP Human 1 Mb CGH array platform for a total of 109 cases: 81 sCRC from Edinburgh

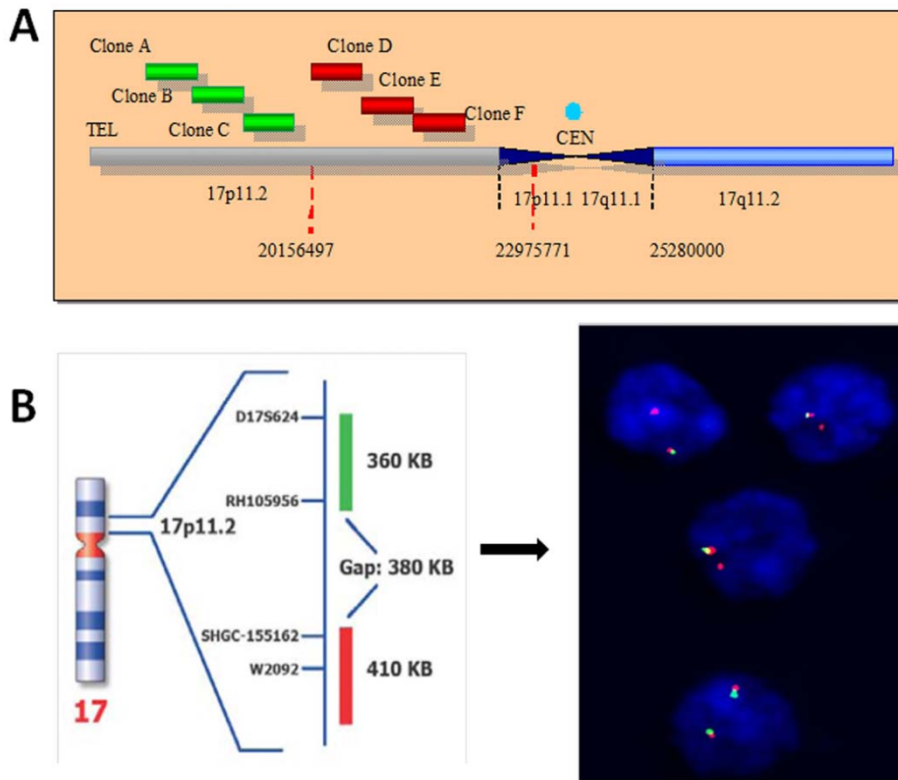


Figure 1. Schematic representation of the chromosome 17p11.2 dual color Break Apart probe combination designed and used for iFISH analysis of this chromosomal region in sCRC. Panel A describes the probe design for which three different clones (A, B and C) directly-labelled with PlatinumBright495 (green signal) and that hybridize to the telomeric part of the 20,156,497 bp region were combined with another three clones (clones D, E and F) directly labelled with PlatinumBright550 and that correspond to sequences harboured centromerically to 20,156,497 bp (red signal), and were produced. The 17p11.2 Break Apart DNA Probe finally consisted of a dual-color assay to detect breakpoints at 17p11.2 using the combination of these 6 fluorescently labelled clones. A positive breakpoint at chromosome 17p11.2 was defined when one or two red/green or yellow fusion signals split into two separate red and green signals. Only red and green signals which were more than one signal diameter apart from each other were counted as reflecting a chromosome break, since based on the probe design a gap of 380 KB exists between the two sets of probes corresponding to the green and the red signals, respectively; two fusion signals identify the two normal chromosomes 17 as illustrated for the lower nuclei shown in panel B. Loss of a green signal in the presence of a single red signal and a fusion signal was interpreted as associated with del(17p) with a 17p11.2 breakpoint (e.g; three upper nuclei in panel B). doi:10.1371/journal.pone.0042683.g001

(Scotland, UK) and 38 from Hong Kong. Gpr files were pre-processed and normalized as described elsewhere [11]. Patients included in this external validation group were classified according to the Duke's staging system as follows: stage A, 7.5% (n=8), B, 44.9% (n=48), C, 39.2% (n=42) and stage D (metastatic), 8.5% (n=9). Median of follow up of these patients was 67 months, with a median overall survival of 28.7 months (range: 0.3–147.2 months).

Statistical methods

For all continuous variables, mean values and their standard deviation (SD) and range were calculated using the SPSS software package (SPSS 15.0 Inc, Chicago, IL USA); for dichotomic variables, frequencies were reported. In order to evaluate the statistical significance of differences observed between groups, 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). Overall survival (OS) curves were plotted according to the method of Kaplan and Meier, and

the log-rank test (one-sided) was used to establish the statistical significance of the differences observed between survival curves (survival; SPSS). Multivariate analysis of prognostic factors for OS was performed using the Cox stepwise regression (forward selection) model (regression, SPSS). For multivariate analysis only those variables showing a significant association with OS in the univariate analysis were included. Statistical significance was considered to be present once *P* values (or, where appropriate, Pearson-corrected *P* values) were $<.05$.

Results

Clinical and biological characteristics of liver metastatic versus non-metastatic sporadic colorectal carcinoma (sCRC)

Overall, sCRC cases with liver metastases showed a higher frequency of lymph node metastases ($p \leq .001$) and abnormally increased CEA serum levels ($p \leq .001$) than non-metastatic patients (Table 1). From the prognostic point of view, sCRC with liver metastases also showed a higher frequency of deaths in association

with a significantly shortened patient overall survival (median of 25 months *vs.* not reached, respectively; $p \leq .001$). By contrast, no significant differences were found between liver metastatic *vs.* non-metastatic CRC cases, regarding patient age, gender, tumor localization, histological grade and size, and alkaline phosphatase serum levels (Table 1).

Chromosomal alterations in metastatic vs non-metastatic sCRC

For most chromosomes analysed, sCRC with liver metastases showed similar cytogenetic profiles to those of non-metastatic tumors; this included similar ($p > .05$) frequencies of del(1p) (48% *vs.* 42%), polysomy of chromosome 7 (59% *vs.* 45%), del(8p) associated to gains of 8q (44% *vs.* 26%), polysomy of chromosome 13 (74% *vs.* 58%), del(18q) (52% *vs.* 32%) and gain of chromosome 20q (63% *vs.* 39%) (Table 2). The only statistically significant differences found between liver metastatic and non-metastatic sCRC were those involving chromosomes 17p ($p < .001$) and 22q ($p = .02$): all cases showing del(22q) corresponded to liver metastatic tumors (0% *vs.* 22%); del(17p13) was found in 74% of liver metastatic *vs.* 19% of non-metastatic cases; del(17p13) with a breakpoint at 17p11.2 was almost exclusively detected among sCRC with liver metastases (67% *vs.* 10%, $p < .001$) (Table 2), and; all except one case with del(22q) ($n = 5$) also demonstrated del(17p11.2) while 16 cases which had del(17p11.2) did not carry del(22q). The remaining 36 tumors carried none of the two chromosomal alterations. Interestingly, whenever these two

chromosomal alterations were detected, either individually or in combination, they were present in all tumor cells, suggesting they had been acquired in the ancestral tumor cell clone.

Overall, a total of 36 genes are coded at the 17p11.2, 17p13.1 and 22q11.2 chromosomal regions (Table 3); 11 out of these 36 genes (31%) have been found to be involved in cancer. The network of functional interactions among these genes and other related downstream genes implicated in cancer is depicted in Figure 2. As shown in it, such cancer-associated genes deleted in sCRC cases with del(17p11.2) and del(22q11.2) directly related to several well-established biomarkers of sCRC such as the *EGFR*, *BCL2*, *BAX* and *TP53* genes [12–15].

Impact of chromosomal alterations and other disease features of liver metastatic vs. non-metastatic sCRC on patient overall survival

Regarding prognosis, the presence of both del(17p13) ($p = .04$) - including del(17p11.2) ($p < .001$) - and del(22q11) ($p < .001$) were associated with a significantly inferior outcome. Other disease features that showed an adverse impact on patient OS were: increased (> 7.5 ng/ml) CEA serum levels ($p < .001$), male gender ($p = .04$), lymph node involvement ($p < .001$) and, metastatic liver disease ($p < .001$) (Figure 3).

Multivariate analysis of the prognostic factors for OS showed that the most informative combination of independent variables to predict an adverse outcome was the presence of del(17p11.2) ($p = .04$) and del(22q11.2) ($p = .002$). Based on these two cyto-

Table 1. Clinical and biological characteristics of liver metastatic ($n = 27$) versus non-metastatic ($n = 31$) sporadic colorectal carcinoma (sCRC) patients.

	Liver metastatic sCRC (n = 27)	Non-metastatic sCRC (n = 31)	p-value	Total cases (n = 58)
Age (years)*	73 (48–80)	72 (38–83)	NS	72 (38–83)
Gender				
F	11 (41%)	9 (29%)	NS	20 (34%)
M	16 (59%)	22 (71%)		38 (66%)
Tumor Localization				
Rectum	5 (19%)	11 (36%)		16 (28%)
Left colon	13 (48%)	15 (48%)	NS	28 (52%)
Right colon	9 (33%)	5 (16%)		14 (20%)
Histological grade				
Well-differentiated	16 (59%)	23 (74%)		39 (67%)
Moderate-differentiated	8 (30%)	7 (22%)	NS	15 (26%)
Poorly-differentiated	3 (11%)	1(4%)		4 (7%)
Histopathology				
pN0	7 (26%)	31 (100%)		38 (66%)
pN1	12 (44%)	0 (0%)	$p \leq 0.001$	12(21%)
pN2	8 (30%)	0 (0%)		8 (13%)
Tumor Size (cm)[#]	5 (2.5–9)	5 (2.5–14)	NS	5 (2.5–14)
Serum ALP (mg/dl)	94 (1–330)	108 (55–495)	NS	101 (1–495)
Serum CEA (ng/ml)	45.4 (0.8–4598)	3.2 (0.6–84)	$p \leq 0.001$	7.2 (0.6–4598)
Deaths	20 (74%)	3 (10%)	$p \leq 0.001$	23 (40%)
Median OS (months)*	25	Not Reached	$p \leq 0.001$	Not Reached

*Results expressed as median (range) or

[#]as number of cases (percentage); NS: statistically not significant ($p > .05$); F: female; M: male; ALP: alkaline phosphatase; CEA: Carcinoembryonic antigen; OS: overall survival.

doi:10.1371/journal.pone.0042683.t001

Table 2. Chromosomal alterations of primary tumors from liver metastatic (n = 27) versus non-metastatic sCRC patients (n = 31).

	Liver metastatic tumors (n = 27)	Non-metastatic tumors (n = 31)	p-value	Total cases (n = 58)
Chromosome 1				
Normal	7 (26%)	14 (45%)		21 (36%)
del(1p)	13 (48%)	13 (42%)	NS	26 (45%)
Polysomy	7 (26%)	4 (13%)		11 (19%)
Chromosome 7				
Normal	5 (19%)	14 (45%)		19 (33%)
del(7q)	5 (19%)	1 (3%)	NS	6 (10%)
q+	1 (3%)	2 (7%)		3 (5%)
Polysomy	16 (59%)	14 (45%)		30 (52%)
Chromosome 8				
Normal	3 (11%)	7 (23%)		10 (17%)
del(8p)	5 (19%)	4 (13%)		9 (15%)
q+	2 (7%)	3 (9%)	NS	5 (9%)
Del(8p)/8q+	12 (44%)	8 (26%)		20 (35%)
Polysomy	5 (19%)	9 (29%)		14 (24%)
Chromosome 13				
Normal	7 (26%)	13 (42%)	NS	20 (35%)
Polysomy	20 (74%)	18 (58%)		38 (65%)
Chromosome 14				
Normal	15 (55%)	19 (61%)		34 (59%)
del(14q)	4 (15%)	1 (3%)	NS	5 (9%)
Polysomy	8 (30%)	11 (36%)		19 (32%)
Chromosome 17				
Normal	5 (19%)	20 (65%)		25 (43%)
del(17p)	20 (70%)	6 (19%)	<i>p</i> < .001	26 (45%)
Polysomy	2 (7%)	5 (16%)		7 (12%)
Del(17p11.2)	18 (67%)	3 (10%)	<i>p</i> < .001	21 (36%)
Chromosome 18				
Normal	13 (48%)	17 (55%)		30 (52%)
del(18q)	14 (52%)	10 (32%)	NS	29 (50%)
Polysomy	0 (0%)	4 (13%)		4 (7%)
Chromosome 20				
Normal	5 (19%)	12 (39%)		17 (27%)
20q+	17 (63%)	12 (39%)	NS	29 (50%)
Polysomy	5 (19%)	7 (22%)		12 (21%)
Chromosome 22				
Normal	15 (56%)	23 (74%)		38 (66%)
del(22q)	6 (22%)	0 (0%)	<i>p</i> = .02	6 (10%)
Polysomy	6 (22%)	8 (26%)		14 (24%)

Results expressed as number of cases and percentage of cases between brackets; NS: statistically not significant (*p* > .05).
doi:10.1371/journal.pone.0042683.t002

netic variables, a scoring system was built to stratify patients into a low- (no adverse features: score 0; n = 24), intermediate- (one adverse feature: score 1; n = 28) and high-risk (two adverse features: score 2; n = 5) groups with significantly different (*p* < .001) OS rates at 5-years: 92%, 53% and 0%, respectively (Figure 3).

Validation of the clinical impact of del(17p11.2) and del(22q) in an independent series of patients

In order to confirm the prognostic impact of the two chromosomal abnormalities described above, we investigated their prognostic impact in an independent series of colorectal cancer patients from the public GEO database (n = 119). Noteworthy, also in this new series, patients whose tumors harboured pericentromeric breakpoints at 17p in the 17p11.2 chromosomal

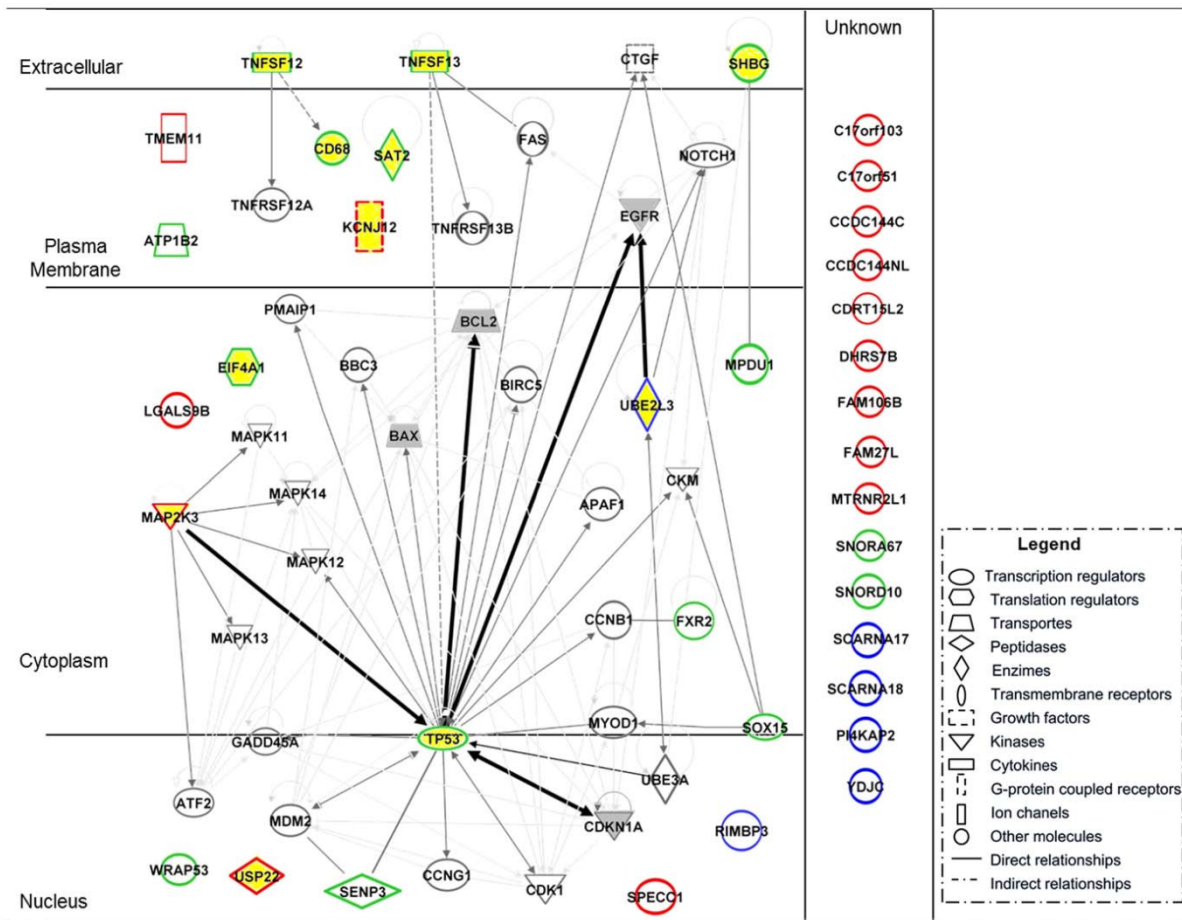


Figure 2. Schematic representation of the network of interactions observed between genes encoded at the 17p11.2 (genes highlighted in red), 17p13.1 (genes highlighted in green) and 22q11.2 (genes highlighted in blue) chromosomal regions, and molecules downstream molecules regulated by these genes which have been associated with cancer or cancer related signalling pathways. Genes highlighted in yellow are encoded at the three chromosomal regions referred above and they have been previously associated with cancer; genes highlighted in grey are considered as biomarkers for sCRC.
doi:10.1371/journal.pone.0042683.g002

region (from 15 to 25 megabases from p-ter) were found to have an inferior clinical outcome than those harbouring del(17p13) alone ($p = .02$ and $p = .04$, respectively). The prognostic impact of del(17p11.2) was even stronger ($p = .01$) when all other tumors which showed pericentromeric deletions, including those with breakpoints in the q-arm close to the centromere (from 15 to 27.5 Mb from p-ter), were considered (Figure S1).

These results support the observations of our dataset and confirm the prognostic impact of del(17p11.2). However, the prognostic impact of del(22q) could not be confirmed ($p > .05$) in this new independent sCRC series of patients.

Discussion

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, when metastasis to the liver and other organs occur, the chances of cure are dramatically reduced. Despite the fact that the understanding of the genetic mechanisms underlying the early stages of both

familial [16] and sporadic CRC has significantly advanced in recent years [17], the genetic mechanisms responsible for progression of sCRC to a metastatic phenotype still remain poorly understood. In this study, we investigated the pattern of numerical chromosomal alterations of primary tumors from metastatic sCRC that exhibited synchronous liver metastases versus non-metastatic sCRC. In order to avoid false-negative non-metastatic cases, in this later group only sCRC with a relative long follow up (median follow-up of 99 months) were selected for the non-metastatic tumor group. Similarly, only liver metastatic cases who had undergone complete resection of both their primary and metastatic tumor, were included in the metastatic patient group.

FISH probes targeting those chromosomal regions more frequently altered in sCRC [6] were specifically applied to the cytogenetic characterization of both patient groups and a new probe for the definition of del(17p) associated with breakpoints at chromosome 17p11.2, was also systematically used. In line with previous observations which show that liver metastatic and non-metastatic sCRC share multiple chromosomal alterations (e.g.

Table 3. List of genes encoded at chromosomal regions identified as being deleted by iFISH probes directed against the 17p11.2 (20156497 bp to 22975771 bp), 17p13.1 (7449445 bp to 7594642 bp) and 22q11.2 (21852397 bp to 21984023 bp) chromosomal regions: gene name, cell localization and function.

Coded name	Gene	Cellular localization	Function
17p11.2			
<i>C17orf103</i>	Chromosome 17 open reading frame 103	Unknown	Unknown
<i>C17orf51</i>	Chromosome 17 open reading frame 51	Unknown	Unknown
<i>CCDC144C</i>	Coiled-coil domain containing 144C	Unknown	Unknown
<i>CCDC144NL</i>	Coiled-coil domain containing 144 family, N-terminal like	Unknown	Unknown
<i>CDRT15L</i>	CMT1A duplicated region transcript 15-like 2	Unknown	Unknown
<i>DHRS7B</i>	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7B	Unknown	Metabolism
<i>FAM106B</i>	Family with sequence similarity 106, member B	Unknown	Unknown
<i>FAM27L</i>	Family with sequence similarity 27-like	Unknown	Unknown
<i>KCNJ12</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	Membrane	Transport
<i>LGALS9B</i>	Lectin, galactoside-binding, soluble, 9B	Cytoplasm	Cell-cell adhesion
<i>MAP2K3</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	Cytoplasm	Cell death
<i>MTRNR2L1</i>	MT-RNR2-like 1	Unknown	Unknown
<i>SPECC1</i>	Sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1	Nucleus	Unknown
<i>TMEM11</i>	Transmembrane protein 11	Membrane	Transport
<i>USP22</i>	Ubiquitin specific peptidase 22	Nucleus	Cell cycle
17p13.1			
<i>ATP1B2</i>	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide	Membrane	Metabolism
<i>CD68</i>	CD68 molecule	Membrane	Metabolism
<i>EIF4A1</i>	eukaryotic translation initiation factor 4A1	Cytoplasm	Metabolism
<i>FXR2</i>	fragile X mental retardation, autosomal homolog 2	Cytoplasm	Metabolism
<i>MPDU1</i>	mannose-P-dolichol utilization defect 1	Cytoplasm	Metabolism
<i>SAT2</i>	spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2	Membrane	Metabolism
<i>SENP3</i>	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3	Nucleus	Metabolism
<i>SHBG</i>	sex hormone-binding globulin	Extracellular	Cell death
<i>SNORA67</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 67	Unknown	Unknown
<i>SNORD10</i>	small nucleolar RNA, C/D box 10	Unknown	Unknown
<i>SOX15</i>	SRY (sex determining region Y)-box 15	Nucleus	Cell differentiation
<i>TNFSF12</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	Extracellular	Cell death
<i>TNFSF13</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	Extracellular	Cell death
<i>TP53</i>	tumor protein p53	Nucleus	Apoptosis
<i>WRAP53</i>	WD repeat containing, antisense to TP53	Nucleus	Telomerase activity
22q11.2			
<i>PI4KAP2</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha pseudogene 2	Unknown	Metabolism
<i>RIMBP3</i>	RIMS binding protein 3	Nucleus	Unknown
<i>SCARNA17</i>	Small Cajal body-specific RNA 17	Unknown	Unknown
<i>SCARNA18</i>	Small Cajal body-specific RNA 18	Unknown	Unknown
<i>UBE2L3</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	Cytoplasm	Metabolism
<i>YDJC</i>	YdjC homolog (bacterial)	Unknown	Metabolism

Genes which have been associated with cancer are shown in bold.
doi:10.1371/journal.pone.0042683.t003

gains of chromosomes 7, 8q, 13q and 20q and losses of the 1p, 8p, 14q, 17p, 18q and 22q chromosomes) [7,18–20], here we also found a similar distribution between liver metastatic and non-metastatic tumors for most chromosomal alterations identified. In contrast, del(22q) and del(17p) (particularly when associated with breakpoints at chromosome 17p11.2), were significantly more prevalent or even restricted, to liver metastatic tumors. These later

findings support a potential role for both del(17p11.2) and del(22q) in the metastatic process of sCRC to the liver.

Previous reports based on cytogenetic analyses of metastatic disease from colorectal tumors indicated that chromosome 17p is frequently lost in sCRC [21,22]. In line with other studies and using similar methodological approaches, our results showed the presence of del(17p13) in almost half of the sCRC cases studied

consequently, coexistence of both chromosomal alterations was associated with a significantly reduced OS *vs.* cases which showed neither of these alterations (OS at 5 years of 0% versus 93%, respectively). Despite the fact that an association has been reported between different chromosomal abnormalities and the prognosis of sCRC [18], to the best of our knowledge this is the first report in which the independent prognostic value of del(17p) with a breakpoint at 17p11.2 and of del(22q) is described. Preliminary results using genome-wide array analyses have shown an association between specific genetic alterations present in primary sCRC tumors and patient survival [10,18,22]. Poulgiannis *et al* (using a DNA microarray platform covering the entire genome at an average of 1 Mb of resolution) identified DNA copy number losses at 18q12.2 to be an independent prognostic marker [10]. In the current study, we have re-analyzed this dataset and confirmed the prognostic value of del(17p) including that of del(17p) with a breakpoint at 17p11.2; in contrast, the clinical impact of del(22q) could not be validated in this series. Although the precise clinical value of del(22q) should be investigated further, validation of our data concerning the prognostic impact of the 17p11.2 breakpoint in an independent dataset (in spite of the substantial differences in the technologies applied in both studies) strengthens the evidence for the clinical relevance of chromosome 17p deletions encompassing genomic regions beyond the *TP53* locus, and points to the potential role of other candidate genes coded at chromosome 17p centromerically to *TP53*. As discussed above, such genes include the *MAP2K3*, *KCNJ12* and *USP22* genes [30–35]. Interestingly, when we searched for direct interactions among the deleted genes and other cancer-associated genes, 30 genes deleted in cases with del(17p), and another 6 genes deleted in cases with del(22q), emerged as directly related to signaling pathways involved in cell growth and proliferation (e.g., *EGFR* and *CDK1A*) as well as in cell death (e.g., *BAX* and *BCL2*). These findings suggest a potential role

for the combined deletion of these genes in conferring poor-prognosis to sCRC with coexisting del(17p) and del(22q), possibly due to increased cell proliferation and survival and diminished DNA repair.

In summary, in the present study we show that the presence of del(17p) with a breakpoint at 17p11.2 is an independent adverse prognostic factor for OS of sCRC. When combined with del(22q11.2) it allowed the identification of three groups of sCRC patients with significantly different outcome, which could be predicted at diagnosis. Further prospective studies are required in larger series of sCRC patients to confirm the prognostic value of the combined assessment of del(17p) and del(22q) in primary tumor samples at diagnosis and the precise role of the deleted genes.

Supporting Information

Figure S1 Validation of the impact of chromosome 17 status on overall survival in an independent series of sCRC patients from the GEO database (n = 109): panel A, del(17p13); panels B and C, del(17p) harbouring pericentromeric breakpoints at chromosome 17p and del(17p) harboring a pericentromeric breakpoint at both chromosomes 17p and 17q, respectively. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AO JMS. Performed the experiments: MGG LMB MLG MMA OB EF. Analyzed the data: MGG CM CF JR MF JMS CT. Contributed reagents/materials/analysis tools: MGG CM CF JR MF JMS. Wrote the paper: MGG LMB CM CF MLG MMA OB EF MF JR AO JMS.

References

- Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, et al. (2007) Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 25: 3238–3245.
- Sayagues JM, Abad Mdel M, Melchor HB, Gutierrez ML, Gonzalez-Gonzalez M, et al. (2010) Intratumoural cytogenetic heterogeneity of sporadic colorectal carcinomas suggests several pathways to liver metastasis. *J Pathol* 221: 308–319.
- Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR (2005) Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer* 104: 2035–2047.
- Ashktorab H, Schaffer AA, Darempouran M, Smoot DT, Lee E, et al. (2010) Distinct genetic alterations in colorectal cancer. *PLoS One* 5: e8879.
- Hu XT, Chen W, Wang D, Shi QL, Zhang FB, et al. (2008) The proteasome subunit PSMA7 located on the 20q13 amplicon is overexpressed and associated with liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 19: 441–446.
- Sayagues JM, Fontanillo C, Abad Mdel M, Gonzalez-Gonzalez M, Sarasquete ME, et al. (2010) Mapping of genetic abnormalities of primary tumours from metastatic CRC by high-resolution SNP arrays. *PLoS One* 5: e13752.
- Camps J, Grade M, Nguyen QT, Hormann P, Becker S, et al. (2008) Chromosomal breakpoints in primary colon cancer cluster at sites of structural variants in the genome. *Cancer Res* 68: 1284–1295.
- World Health Organization. WHO (1981) International Histological Classification of Tumors V-G, 1967–1981; 2nd edn, Berlin: Springer-Verlag, 1988–1992.
- Munoz-Bellvis L, Fontanillo C, Gonzalez-Gonzalez M, Garcia E, Iglesias M, et al. (2012) Unique genetic profile of sporadic colorectal cancer liver metastasis versus primary tumors as defined by high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Mod Pathol*.
- Poulgiannis G, Ichimura K, Hamoudi RA, Luo F, Leung SY, et al. (2010) Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. *J Pathol* 220: 338–347.
- Mackintosh C, Ordóñez JL, García-Domínguez DJ, Sevillano V, Llombart-Bosch A, et al. (2012) 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene* 31: 1287–1298.
- Re M, Magliulo G, Tarchini P, Mallardi V, Rubini C, et al. (2011) p53 and BCL-2 over-expression inversely correlates with histological differentiation in occupational ethmoidal intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24: 603–609.
- Asghar U, Hawkes E, Cunningham D. (2010) Predictive and prognostic biomarkers for targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 9: 274–281.
- Yashiro M, Hirakawa K, Boland CR (2010) Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC Cancer* 10: 303.
- Seicean R, Crisan D, Boers JE, Mocan T, Seicean A, et al. (2011) The prognostic role of apoptosis mediators in rectal adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 58: 1490–1494.
- Syngal S, Fox EA, Li C, Dovidio M, Eng C, et al. (1999) Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *JAMA* 282: 247–253.
- Maltzman T, Knoll K, Martinez ME, Byers T, Stevens BR, et al. (2001) Ki-ras proto-oncogene mutations in sporadic colorectal adenomas: relationship to histologic and clinical characteristics. *Gastroenterology* 121: 302–309.
- Sheffer M, Bacolod MD, Zuk O, Giardina SF, Pincas H, et al. (2009) Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7131–7136.
- Derks S, Postma C, Carvalho B, van den Bosch SM, Moerkkerk PT, et al. (2008) Integrated analysis of chromosomal, microsatellite and epigenetic instability in colorectal cancer identifies specific associations between promoter methylation of pivotal tumour suppressor and DNA repair genes and specific chromosomal alterations. *Carcinogenesis* 29: 434–439.
- Popat S, Zhao D, Chen Z, Pan H, Shao Y, et al. (2007) Relationship between chromosome 18q status and colorectal cancer prognosis: a prospective, blinded analysis of 280 patients. *Anticancer Res* 27: 627–633.
- Khine K, Smith DR, Goh HS (1994) High frequency of allelic deletion on chromosome 17p in advanced colorectal cancer. *Cancer* 73: 28–35.
- Diep CB, Thorstensen L, Meling GI, Skovlund E, Rognum TO, et al. (2003) Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 21: 820–829.
- García J, Duran A, Tabernero MD, García Plaza A, Flores Corral T, et al. (2003) Numerical abnormalities of chromosomes 17 and 18 in sporadic colorectal cancer: Incidence and correlation with clinical and biological findings and the prognosis of the disease. *Cytometry B Clin Cytom* 51: 14–20.

Prognostic Stratification of sCRC

24. Riso M, Casorzo L, Chicchio L, De Rosa G, Rossini FP (2003) Deletions of 17p are associated with transition from early to advanced colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 147: 44–49.
25. Losi L, Luppi G, Benhattar J (2004) Assessment of K-ras, Smad4 and p53 gene alterations in colorectal metastases and their role in the metastatic process. *Oncol Rep* 12: 1221–1225.
26. Iino H, Fukayama M, Maeda Y, Koike M, Mori T, et al. (1994) Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. 17p, 18q, and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* 73: 1324–1331.
27. Chang SC, Lin JK, Lin TC, Liang WY (2005) Genetic alteration of p53, but not overexpression of intratumoral p53 protein, or serum p53 antibody is a prognostic factor in sporadic colorectal adenocarcinoma. *Int J Oncol* 26: 65–75.
28. Paredes-Zaghlul A, Kang JJ, Essig YP, Mao W, Irby R, et al. (1998) Analysis of colorectal cancer by comparative genomic hybridization: evidence for induction of the metastatic phenotype by loss of tumor suppressor genes. *Clin Cancer Res* 4: 879–886.
29. Kim DH, Lee ST, Won HH, Kim S, Kim MJ, et al. (2011) A genome-wide association study identifies novel loci associated with susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Blood* 117: 6906–6911.
30. Gurtner A, Starace G, Norelli G, Piaggio G, Sacchi A, et al. (2010) Mutant p53-induced up-regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 contributes to gain of function. *J Biol Chem* 285: 14160–14169.
31. Jia M, Souchehnytskyi N, Hellman U, O'Hare M, Jat PS, et al. (2010) Proteome profiling of immortalization-to-senescence transition of human breast epithelial cells identified MAP2K3 as a senescence-promoting protein which is downregulated in human breast cancer. *Proteomics Clin Appl* 4: 816–828.
32. Sher RB, Cox GA, Mills KD, Sundberg JP (2011) Rhabdomyosarcomas in aging A/J mice. *PLoS One* 6: e23498.
33. Liu YL, Yang YM, Xu H, Dong XS (2011) Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 103: 283–289.
34. Liu YL, Jiang SX, Yang YM, Xu H, Liu JL, et al. (2012) USP22 acts as an oncogene by the activation of BMI-1-mediated INK4a/ARF pathway and Akt pathway. *Cell Biochem Biophys* 62: 229–235.
35. Liu YL, Yang YM, Xu H, Dong XS (2010) Increased expression of ubiquitin-specific protease 22 can promote cancer progression and predict therapy failure in human colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 25: 1800–1805.
36. Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, et al. (1999) Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 117: 831–837.
37. Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK (2000) A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res* 60: 2836–2839.
38. Al-Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD (1999) Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 24: 306–314.
39. Yana I, Kurahashi H, Nakamori S, Kameyama M, Nakamura T, et al. (1995) Frequent loss of heterozygosity at telomeric loci on 22q in sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer* 60: 174–177.
40. Ghadimi BM, Grade M, Monkemeyer C, Kulle B, Gaedcke J, et al. (2006) Distinct chromosomal profiles in metastasizing and non-metastasizing colorectal carcinomas. *Cell Oncol* 28: 273–281.

**Identificación de un perfil genético característico del
cáncer colorrectal esporádico metastásico empleando
arrays de polimorfismos de nucleótido único de alta
resolución**

María González-González¹, Celia Fontanillo^{2,3}, María Mar Abad⁴, María
Laura Gutiérrez¹, Inés Mota¹, Oscar Bengoechea⁴, Ángel Santos-Briz⁴,
Oscar Blanco⁴, Emilio Fonseca⁵, Juana Ciudad¹, Manuel Fuentes¹, Javier
De Las Rivas², José Antonio Alcázar⁶, Jacinto García⁶, Luis Muñoz-Bellvis⁶,
Alberto Orfao^{1*} y Jose María Sayagues^{1*}

1 Servicio General de Citometría-NUCLEUS, Departamento de Medicina y Centro de
Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL,
Universidad de Salamanca

2 Grupo de Investigación en Bioinformática y Genómica Funcional, Centro de
Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca

3 Celgene Institute for Translational Research Europe (CITRE)

4 Departamento de Patología, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

5 Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

6 Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática, Departamento de Cirugía, Hospital
Universitario de Salamanca-IBSAL

Cancer. 2014 Jul 1;120(13):1948-59.

doi: 10.1002/cncr.28681.

2

Introducción. La diseminación metastásica, especialmente en el tejido hepático, constituye la principal causa de muerte de pacientes con cáncer colorrectal esporádico (sCRC). El proceso metastásico está relacionado, con un trasfondo característico de alteraciones genéticas acumuladas ya en las células tumorales que constituyen el tumor primario, y que afectan principalmente a los procesos de crecimiento, proliferación y muerte celular. Recientemente, se han identificado múltiples anomalías cromosómicas características de los tumores primarios de pacientes con CRC metastásico, entre las que se incluyen ganancias de las regiones cromosómicas 8q, 13q, y 20q y pérdidas de 1p, 8p, 17p, 18q y 22q. En un estudio reciente de nuestro grupo basado en técnicas de hibridación *in situ* fluorescente sobre núcleos interfásicos (*i*FISH) pudimos establecer, además del valor pronóstico adverso de la del(17p) y de la del(22q), la presencia de otras alteraciones citogenéticas altamente prevalentes entre pacientes con sCRC y metástasis hepáticas sincrónicas. Sin embargo, estos estudios se han basado (fundamentalmente) en técnicas de sensibilidad limitada dirigidas al estudio únicamente de una parte de todo el genoma, como ocurre en las técnicas de citogenética convencional y de *i*FISH. En los últimos años, se han desarrollado nuevas herramientas que permiten el análisis global de todo el genoma, como los arrays de polimorfismo de nucleótido único (SNP), de alta resolución; con ellos podemos identificar alteraciones de pequeñas regiones cromosómicas presentes a lo largo de todo el genoma con una elevada resolución, sin que se haya empleado hasta el momento de realizar este trabajo doctoral este tipo de metodología para la identificación de marcadores genéticos asociados a un mayor riesgo de desarrollar metástasis a distancia en pacientes con sCRC.

Objetivo. El objetivo central de este trabajo fue definir perfiles de alteraciones numéricas de cromosomas características del sCRC metastásico, ausentes en sCRC no metastásicos, para poder con ello profundizar en el conocimiento de la genética del proceso metastásico de este tipo de cáncer, además de identificar pacientes que están en riesgo de presentar o desarrollar metástasis hepáticas, ya en el momento del diagnóstico.

Pacientes, materiales y métodos. Analizamos un total de 49 muestras representativas, de tumores primarios de pacientes diagnosticados de sCRC entre junio de 2000 y septiembre de 2007, y clasificados

según los criterios de la OMS. Ningún paciente había recibido tratamiento de forma previa al estudio, siendo la mediana de seguimiento en el momento de cerrar el estudio de 97 meses. De los 49 pacientes estudiados, 23 (47%) presentaban metástasis hepáticas en el momento de la cirugía colorrectal (n=14) o la desarrollaron durante el primer año después del diagnóstico (n=9), mientras que los restantes 26 pacientes (53%) no desarrollaron diseminación metastásica durante un tiempo prolongado de seguimiento. Para los estudios genéticos empleamos microarrays de SNPs de alta resolución -500 K (Affymetrix, Santa Clara, CA)-; para ello se extrajo el ADN tumoral de muestras procedentes de tumores primarios que contenían $\geq 65\%$ de células tumorales, empleando el reactivo comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Empleando la misma metodología se extrajo ADN normal de muestras pareadas de leucocitos de sangre periférica de los mismos pacientes. Para la identificación de alteraciones en el número de copias del ADN (CNA) de todo el genoma tumoral se comparó el ADN tumoral frente al ADN leucocitario normal de cada individuo empleando el programa informático Arom de la casa comercial Affymetrix, y el método CRMA disponible en el paquete informático R (R Foundation for Statistical Computation). Para la identificación de las ganancias o pérdidas en el número de copias de una secuencia concreta de ADN (CNA) se estableció un umbral basado en los cambios observados en la intensidad de fluorescencia para el segmento de ADN tumoral que contenía dicha secuencia, respecto al ADN normal leucocitario; en paralelo, se compararon también las secuencias de ADN de muestras tumorales de sCRC metastásico vs. sCRC no metastásico, para definir patrones diferenciales de alteración genética entre ambos grupos de tumores primarios, en base a valores de $p < 0.001$, (tras corregirlos para FDR < 0.05) para el test de la T de Student. Se definió como conteniendo CNA aquellas regiones en las que al menos 7 SNP contiguos presentaban el mismo tipo de CNA. Para la identificación de los genes codificados en las regiones cromosómicas alteradas, se empleó la herramienta Ensembl (www.ensembl.org). En paralelo, se llevó a cabo estudio de *FISH* con 8 sondas dirigidas frente a los cromosomas y regiones cromosómicas más frecuentemente alterados en los tumores sCRC con el fin de evaluar la reproducibilidad de los microarrays de SNPs. Para determinar el significado estadístico de las diferencias observadas entre grupos, empleamos los test de la T de Student y de la U Mann-Whitney para variables continuas, según presentaran o no una distribución normal, respectivamente; para las variables cualitativas, se aplicó la

prueba de la χ^2 . La construcción de curvas de supervivencia global (SG) se llevó a cabo de acuerdo con el método de Kaplan y Meier, utilizando la prueba de *log-rank* para definir el significado estadístico de las diferencias entre dichas curvas de supervivencia. Para el análisis multivariante de factores pronósticos para la SG, se empleó el método de la regresión por pasos de Cox. El umbral de significación estadística se situó en probabilidades de error (valores de p) ≤ 0.05 .

Resultados. En términos globales, la mayor parte de las CNA detectadas fueron comunes a los tumores primarios metastásicos y no metastásicos de los pacientes con sCRC estudiados, incluyendo en dichas alteraciones las pérdidas de las regiones cromosómicas 3p, 4, 5q, 8p, 10q, 15p y 22q, además de la monosomía del cromosoma 14, y de a las ganancias de los cromosomas 1q, 2p, 3q, 5p, 6p, 8q, 11p y 20q. Sin embargo, cabe señalar que la frecuencia de alteración de muchas de las regiones afectadas era significativamente diferente en ambos grupos de pacientes, siendo especialmente diferente la frecuencia de alteración de 58 regiones cromosómicas correspondientes a pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 17p, y 18q, y a ganancias de los cromosomas 7 y 13q ($p < 0,05$), alteraciones que están presentes en un mayor porcentaje de tumores primarios de pacientes con sCRC metastásico. De estas 58 alteraciones, las pérdidas afectaban a 23 regiones cromosómicas, de las que 19 mostraron estar relacionadas con un pronóstico más adverso, especialmente las localizadas en las regiones cromosómicas 18q21 y 18q22, que se asociaban a tasas de SG significativamente más cortas ($p < 0,01$). De forma similar, identificamos ganancias cromosómicas, que involucraban a 35 regiones con distinta prevalencia en el sCRC no metastásico vs. metastásico; de ellas, 23 se asociaron con mal pronóstico, especialmente las localizadas en las regiones cromosómicas 7p11 y 13q31 ($p < 0,01$). Al correlacionar los resultados obtenidos mediante arrays de SNPs e *iFISH* pudimos confirmar la existencia de un elevado grado de correlación ($r^2 = 0.61$) entre ambas técnicas, lo cual apoya el uso de los microarrays de SNPs para realizar un barrido de CNA de todo el genoma, en tumores de pacientes con sCRC. Las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas en los sCRC metastásicos y cuya alteración se asociaba con una SG significativamente más corta, incluían un total de 78 genes; de ellos 52 correspondían a genes codificados en las regiones cromosómicas delecionadas, y los 26

restantes a genes codificados en las regiones cromosómicas ganadas, correspondiendo todos ellos a genes que previamente se habían relacionado con el CCR y/o el proceso metastásico.

Conclusiones. Nuestros resultados permiten definir un patrón de alteraciones en el número de copias de ADN tumoral característico del sCRC metastásico en el que se incluyen deleciones de ADN que afectan a 23 regiones que afectan principalmente a los cromosomas 1p, 17p y 18q, y ganancias de ADN localizadas en 35 regiones cromosómicas distintas, especialmente a nivel de los cromosomas 7 y 13q. Además, dentro de estas alteraciones identificamos pérdidas de las regiones cromosómicas, 18q21 y 18q22 y ganancias de 7p11 y 13q31, regiones en las que están codificados un elevado número de genes asociados a sCRC y/o a procesos metastáticos, que muestran un impacto pronóstico adverso sobre la SG de pacientes con sCRC.

Original Article

Identification of a Characteristic Copy Number Alteration Profile by High-Resolution Single Nucleotide Polymorphism Arrays Associated With Metastatic Sporadic Colorectal Cancer

María González-González, BS¹; Celia Fontanillo, PhD^{2,3}; María M. Abad, MD, PhD⁴; María L. Gutiérrez, BS¹; Ines Mota, BS¹; Oscar Bengoechea, MD, PhD⁴; Ángel Santos-Briz, MD, PhD⁴; Oscar Blanco, MD, PhD⁴; Emilio Fonseca, MD, PhD⁵; Juana Ciudad, PhD¹; Manuel Fuentes, PhD¹; Javier De Las Rivas, PhD²; José A. Alcazar, MD, PhD⁶; Jacinto García, MD, PhD⁶; Luís Muñoz-Bellvis, MD, PhD⁶; Alberto Orfao, MD, PhD¹; and José M. Sayagués, PhD¹

BACKGROUND: Metastatic dissemination is the most frequent cause of death in patients with sporadic colorectal cancer (sCRC). It is believed that the metastatic process is related at least in part to a specific background of genetic alterations accumulated in cells from primary tumors, and the ability to detect such alterations is critical for the identification of patients with sCRC who are at risk of developing metastases. **METHODS:** The authors used high-resolution, 500-K single nucleotide polymorphism arrays to identify copy number alteration profiles present at diagnosis in primary tumors from patients with metastatic (n = 23) versus nonmetastatic (n = 26) sCRC. **RESULTS:** The results revealed a characteristic pattern of copy number alterations in metastatic sCRC tumors that involved losses of 23 regions at chromosomes 1p, 17p, and 18q, together with gains of 35 regions at chromosomes 7 and 13q. **CONCLUSIONS:** In line with expectations, the copy number profile investigated involved multiple genes that were associated previously with sCRC (ie, *SMAD2*) and/or the metastatic process (ie, podocalyxin-like [*PODXL*]), and it also was associated with a poorer outcome. *Cancer* 2014;120:1948-59. © 2014 American Cancer Society.

KEYWORDS: liver metastases, colorectal carcinoma, copy number change, single nucleotide polymorphism array.

INTRODUCTION

Sporadic colorectal cancer (sCRC) is the second leading cause of death from cancer in the Western world.¹ Up to 50% of all patients with sCRC eventually will develop metastases, and their 5-year overall survival rate is approximately 50% to 60%.² Once metastases (ie, mostly liver metastasis) have occurred, a complete cure is unlikely,² and up to two-thirds of patients with sCRC who die have evidence of liver metastasis.³ Accumulating evidence indicates that sCRC metastasis may emerge in the context of a specific genetic tumor background associated or not with other genetic alterations, further affecting cellular control of growth and proliferation.⁴ The discovery of those specific genetic alterations that would contribute toward identifying 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 diseases.

In recent years, multiple recurrent chromosomal abnormalities identified in primary tumors have been associated with metastatic CRC.^{4,5} Among others, these include numerical gains of the long arm of chromosome 8 (8q), 13q, and 20q and losses of the short arm of chromosome 1 (1p), 8p, 17p, 18q, and 22q. In a recent study, we used interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH) to further establish that 17p deletion (del[17p]) involving the 17p11.2 breakpoint region and del(22q) were highly prevalent cytogenetic alterations among patients with primary sCRC who had synchronous liver metastasis.⁶ However, the identification of specific genes targeted by such chromosomal alterations has proven difficult, partially because of technical issues. In recent years, the development of genome-wide approaches like high-

Corresponding authors: Alberto Orfao, MD, PhD, or José María Sayagués, PhD, Centro de Investigación del Cáncer, Paseo de la Universidad de Coimbra S/N, 37007 Salamanca, Spain; Fax: (011) 34-923-294795; orfao@usal.es

¹General Cytometry Service-Nucleus, Department of Medicine and Cancer Research Center, Institute of Molecular Biology and Cellular Oncology of the University of Salamanca and Salamanca Institute of Biomedical Research, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ²Bioinformatics and Functional Genomics Unit, Institute of Molecular Biology and Cellular Oncology/Spanish National Research Council, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ³Celgene Institute for Translational Research Europe (CITRE), Seville, Spain; ⁴Department of Pathology, University Hospital of Salamanca-Salamanca Institute of Biomedical Research, Salamanca, Spain; ⁵Service of Medical Oncology, University Hospital of Salamanca-Salamanca Institute of Biomedical Research, Salamanca, Spain; ⁶Department of General and Digestive Surgery, University Hospital of Salamanca-Salamanca Institute of Biomedical Research, Salamanca, Spain

The last 2 authors contributed equally to this work.

DOI: 10.1002/cncr.28681, **Received:** October 11, 2013; **Revised:** January 7, 2014; **Accepted:** February 12, 2014, **Published online** March 25, 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

density single nucleotide polymorphism (SNP) arrays has made it possible to identify small regions of chromosomal gains and losses with much greater resolution, down to 2.5 kb.⁵

In the current study, we used 500-K SNP arrays (mean distance between interrogated SNPs = 5.8 kb) to map genetic alterations that were present already at diagnosis in primary tumors from 49 patients with sCRC (23 metastatic tumors vs 26 nonmetastatic tumors). Our main objective was to define differential copy number alteration (CNA) profiles between metastatic and nonmetastatic tumors for a better understanding of the genetics of the metastatic process in sCRC. To evaluate the reproducibility of the SNP-array results, we performed parallel iFISH analyses of the same tumor samples using 8 probes directed against the chromosomes that are most frequently altered in sCRC.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

Surgical specimens from 49 patients who were diagnosed with sCRC between June 2000 and September 2007 were collected prospectively and included in this study after informed consent was obtained from each patient. All patients underwent surgical resection of tumor tissues at the Department of Surgery of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain) and were diagnosed and classified according to World Health Organization criteria⁷ before they received any treatment. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca. The median follow-up at the time the study was closed was 97 months (range, 24-124 months). Of 49 patients, 23 (47%) had liver metastases (group 1) identified either at the time of colorectal surgery ($n = 14$) or during the first year after diagnosis ($n = 9$). The other 26 patients (53%) had tumors without metastatic dissemination during long a follow-up (group 2). The clinical and laboratory data from these patients are summarized in Table 1.

After the histopathologic diagnosis was established, samples from representative areas of the primary tumors that exhibited macroscopic infiltration were either fixed in formalin and embedded in paraffin or frozen in liquid nitrogen and then stored either at room temperature or at -80°C , respectively. From these tissue samples, sections were cut from 3 different areas representative of the tumor tissue used for the SNP-array studies, and they were placed over poly L-lysine-coated slides. For SNP-array studies, tumor DNA was extracted from freshly frozen tu-

mor samples that contained $\geq 65\%$ epithelial tumor cells. In turn, normal DNA was extracted from matched peripheral blood (PB) leukocytes from the same patient. For both types of samples, DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

SNP-Array Studies

Each DNA sample derived from primary tumors and normal PB leukocytes was hybridized to 2 different 250-K Affymetrix SNP mapping arrays (*NspI* and *StyI* SNP arrays; Affymetrix, Santa Clara, Calif). For this purpose, 250 ng of DNA per array were used according to the instructions of the manufacturer. Fluorescence signals were detected using the Affymetrix GeneChip Scanner 3000. Average genotyping call rates of 94.4%, 95.6%, and 97.6% were obtained from primary tumors corresponding to the metastatic tumors (group 1), the nonmetastatic tumors (group 2), and normal PB DNA samples, respectively.

To identify copy number changes throughout the whole tumor genome, the *aroma.affymetrix* algorithm was used, following the CRMA version 2 method in the R software package, as described elsewhere⁸ (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; available at: <http://www.aroma-project.org>, accessed March 18, 2014). The array normalization steps we used have been described previously by Munoz-Bellvis et al.⁵ Next, data from the 250-K *StyI* and 250-K *NspI* arrays were integrated into a single database, and raw copy number values were calculated as transformed log₂ 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.

To identify DNA regions with similar copy number values, the circular binary segmentation method with default parameters was used exactly as implemented in the open-source DNACopy Bioconductor software package (Bioconductor Project Core Team, Fred Hutchison Cancer Research Center, Seattle, Wash)⁹; the criteria used to define single-point copy number changes were based on P values $\leq .01$ for ≥ 7 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 group 1 primary tumor versus PB, for group 2 primary tumor versus PB, and for group 1 versus group 2 primary tumor samples (log₂ ratio cutoff values of >0.09 and <-0.09 for copy number gains and losses,

Original Article

TABLE 1. Clinical and Biologic Characteristics of Patients With Metastatic (N = 23) Versus Nonmetastatic (n = 26) Sporadic Colorectal Carcinoma^a

Characteristic	No. of Patients (%)		P	No. of Patients (%): All sCRC, n = 49
	Metastatic sCRC, n = 23	Nonmetastatic sCRC, n = 26		
Age: Median [range], y	68 [48–80]	67 [38–83]	NS	68 [38–83]
Sex				
Women	8 (35)	7 (27)	NS	15 (31)
Men	15 (65)	19 (73)		34 (69)
Tumor localization				
Rectum	7 (31)	3 (11)	NS	10 (20)
Left colon	12 (52)	14 (54)		26 (53)
Right colon	4 (17)	9 (35)		13 (27)
Histopathologic grade				
Well differentiated	13 (56)	19 (73)	NS	32 (65)
Moderately differentiated	8 (35)	6 (23)		14 (29)
Poorly differentiated	2 (9)	1 (4)		3 (6)
Histopathologic tumor classification				
pT1	0 (0)	1 (4)	.05	1 (2)
pT2	0 (0)	6 (23)		6 (12)
pT3	16 (70)	11 (42)		27 (55)
pT4	7 (30)	8 (31)		15 (31)
Histopathologic lymph node status				
pN0	7 (30)	26 (100)	< .001	33 (67)
pN1	10 (45)	0 (0)		10 (20)
pN2	6 (26)	0 (0)		6 (12)
Tumor size: Median [range], cm	5 [2.5–9.0]	5 [2.5–14.0]	NS	5 [2.5–14.0]
Serum CEA: Median [range], ng/mL	58.3 [0.8–1484.0]	3.1 [0.6–18.0]	< .001	7 [0.6–1484.0]
Adjuvant treatment			NA	
No treatment	2 (12)	8 (35)		10 (26)
5-FU	4 (25)	12 (52)		16 (41)
Tegafur	2 (12)	3 (13)		5 (13)
Capacitabine	2 (12)	0 (0)		2 (5)
Capecitabine + oxaliplatin	1 (7)	0 (0)		1 (2)
Tegafur + irinotecan	2 (12)	0 (0)		2 (5)
5-FU, irinotecan, + bevacizumab	3 (20)	0 (0)		3 (8)
No. of deaths (%)	18 (78)	2 (8)	< .001	20 (41)
OS: Median [range], mo	26 [1–96]	Not reached	< .001	Not reached

Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; CEA, carcinoembryonic antigen; NA, not applicable; NS, statistically nonsignificant ($P > .05$); OS, overall survival; sCRC, sporadic colorectal cancer.

^aSurvival analysis was performed using the Kaplan-Meier method and the significance of the differences between survival curves were assessed using a 1-sided log-rank test.

respectively). For each tumor sample analyzed, the specific frequencies of both copy number gains and losses per SNP were established and plotted along individual chromosomes. Common altered regions were identified based on the empirical frequency distribution of gains and losses among group 1 and group 2 primary tumor samples, respectively, by grouping contiguous SNPs that had adjusted P values $< .01$ (false discovery rate [FDR] correction was based on the Benjamini and Hochberg procedure).¹⁰ Moderated t test analyses were used to identify significant differences in copy numbers between metastatic and nonmetastatic samples (FDR-corrected P values $< .05$). Significant regions were defined as contiguous sets of at least 7 SNPs that differed significantly. A P value was assigned to the region by using the worst FDR-corrected P value among the SNPs included in that region. Genes

coded in these regions were identified using the Ensembl release 53 tool (available at: <http://www.ensembl.org>, accessed March 18, 2014).

iFISH Studies

To evaluate the reproducibility of the SNP-array results and to assess the impact of background noise using this technique, iFISH analyses of the same tumor samples were performed in parallel, using 8 probes directed against an identical number of regions from 8 different human chromosomes (Table 2).

Additional Statistical Methods

For all continuous variables, mean values with standard deviations and ranges were calculated using the SPSS software package (SPSS version 15.0; SPSS Inc., Chicago, Ill;

for dichotomic variables, frequencies were reported. To evaluate the statistical significance of differences observed between groups, the Student *t* test and the Mann-Whitney *U* test were used for continuous variables, depending on whether they did or did not display a normal distribution; for qualitative variables, the chi-square test was applied (Cross-Tab; SPSS Inc.). Survival analyses were performed using the Kaplan-Meier method, and the significance of differences in survival between different groups was assessed using a 1-sided log-rank test. Hazard ratios were calculated for each particular chromosomal region using a Cox proportional hazards model as implemented in the “survival” R package (R Foundation for Statistical Computing) using the Efrom approximation to control for ties in survival times. The assumption for proportional odds was tested using the partial likelihood-ratio test. Right-censored observations were considered those observations in which the event of death had not occurred at the date of last contact, ie, the date of the censored observation. These right-censored observations were taken into account in the estimation of the partial likelihood as follows:

$$L(\beta) = \prod_{i=1}^n \left[\frac{e^{x_i^T \beta}}{\sum_{k \in R(t_{(i)})} e^{x_k^T \beta}} \right]^{\delta_i}$$

where $\delta_i = 1$ if $t_{(i)}$ is a time-of-death event, and $\delta_i = 0$ if $t_{(i)}$ is the time of censoring. Statistical significance was considered present if the *P* value (or the Pearson-corrected *P* value) was $< .05$. Only those iFISH probes with >12 SNPs localized in the iFISH mapped region (Table 2) were used for correlation studies, and the copy number status was identified by the SNP array (gain vs loss vs no change) for those SNPs localized at each iFISH region. *P* values $< .01$ were associated with statistical significance.

RESULTS

Clinical and Biologic Characteristics of Liver Metastatic Versus Nonmetastatic sCRC

Overall, patients who had sCRC with liver metastases had a greater frequency of lymph node metastases ($P < .001$) and abnormally increased serum carcinoembryonic antigen levels ($P < .001$) than patients who had sCRC without metastases (Table 1). From the prognostic point of view, those who had sCRC with liver metastases also had more deaths associated with significantly shortened overall survival (median, 26 months vs not reached, respectively; $P < .001$). By contrast, no significant differences were observed between patients with versus without liver-

TABLE 2. Primary Colorectal Cancer (n = 49): Correlation Between the Numerical Changes Detected by Each Individual Fluorescence in Situ Hybridization Probe Used and the Copy Number Changes Identified for the Corresponding Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Through SNP Array Studies

Chromosomal Region Identified by iFISH (iFISH Probe)	DNA Probe ^a	R ²	P
7q31	LSI D7S522 (SO)/CEP 7 (SG)	0.60	< .0001
8p12	LSI LPL (SO)	0.59	< .0001
13q14	LSI 13 (RB1) 13q14 (SO)	0.58	< .0001
14q32	LSI IGH (SG)/BCL2 (SO)	0.69	< .0001
17p13.1	LSI TP53 (17p13.1) (SO)	0.65	< .0001
18q21	LSI IGH (SG)/BCL2 (SO)	0.52	.0001
20q13	LSI ZNF217 (20q13.2) (SO)	0.64	< .0001
22q11	LSI 22 (BCR) (SG)	0.62	< .0001

Abbreviations: iFISH, interphase fluorescence in situ hybridization; R², coefficient of correlation; SG, SpectrumGreen probe; SO, SpectrumOrange probe;

^aThe commercial source for all DNA probes was Vysis Inc. (Downers Grove, Ill).

metastatic sCRC regarding patient age, sex, tumor localization, histologic grade, or size.

Differences in Copy Number Alterations of Primary Tumors Between Metastatic and Nonmetastatic sCRC

Overall, many different CNAs were common in both metastatic and nonmetastatic primary sCRCs. These included deletions involving chromosomes 3p, 4, 5q, 8p, 10q, 15p, and 22q; whole chromosome 14 losses; and gains of chromosomes 1q, 2p, 3q, 5p, 6p, 8q, 11p, and 20q (Fig. 1). However, differences in the relative percentage of tumors that had some of these specific copy number changes also were observed between the 2 tumor groups (Tables 3 and 4). These mostly included differences in the frequency of deleted regions in chromosomes 1p, 17p, and 18q together with gains of chromosomes 7 and 13q, all of which had a greater incidence ($P < .05$) among primary tumors from patients who presented with metastatic versus nonmetastatic disease. A comparison between the specific copy number changes that were present differentially in both groups of tumors revealed a total of 58 altered chromosomal regions, all of which were identified more frequently ($P < .05$) in metastatic tumors versus nonmetastatic tumors. From these, 23 copy number changes corresponded to interstitial deletions at 1p36 (n = 1), 1p33 (n = 1), 17p12 (n = 1), 18q11 (n = 1), 18q11 (n = 3), 18q21 (n = 7), 18q12 (n = 3), 18q21 (n = 9), 18q22 (n = 4), and 18q23 (n = 1); and 35 corresponded to regions of gain at 7p22 (n = 6), 7p15 (n = 1),

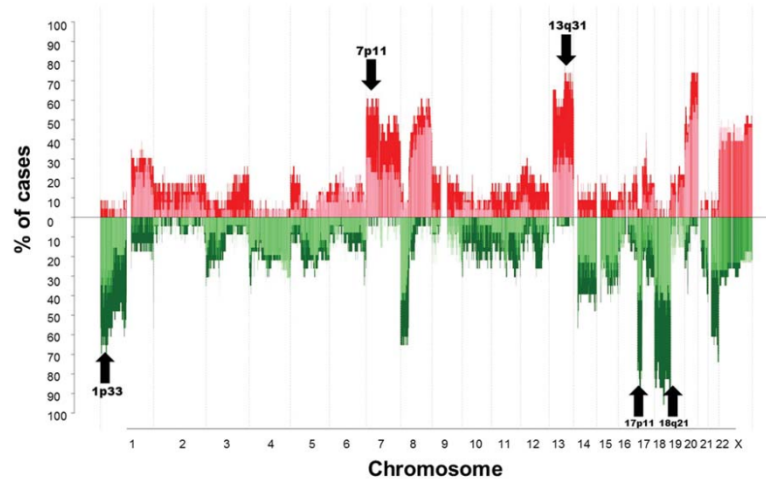


Figure 1. Copy number changes were detected in patients with metastatic ($n = 23$) versus nonmetastatic ($n = 26$) sporadic colorectal cancer genotyped on the Affymetrix 500-K single nucleotide polymorphism-array platform. This summary plot illustrates the frequency of copy number gains (plotted in red above zero values in the x-axis) and losses (plotted in green below zero values in the x-axis) identified in patients with metastatic primary sporadic colorectal tumors (dark colors) and in patients with non-metastatic tumors (light color) for the whole human genome. Gains of chromosomes 7 and 13 and losses of chromosomes 1p, 17p, and 18 (indicated by arrows) were observed more frequently ($P < .05$) in metastatic tumors versus nonmetastatic tumors.

7p14 ($n = 1$), 7p13 ($n = 1$), 7p12 ($n = 3$), 7p11 ($n = 1$), 7q11 ($n = 2$), 7q22 ($n = 1$), 7q32 ($n = 3$), 7q33 ($n = 1$), 7q34 ($n = 2$), 13q22 ($n = 2$), 13q31 ($n = 4$), 13q32 ($n = 2$), 13q33 ($n = 3$), and 13q34 ($n = 2$).

Impact of CNAs on Overall Survival in Patients With sCRC

From the 23 interstitial deletions described above that were observed more frequently in metastatic versus nonmetastatic primary sCRC tumors, 19 deletions (83%) were associated with a poorer outcome ($P < .05$) (Table 3); furthermore, 3 of these 19 interstitial deletions, all of which were localized to chromosome 18 (base pairs [bp], from start to end)—18q21 (bp 44,879,066-45,497,910), 18q22 (bp 71,062,175-71,979,380 and bp 71,991,789-72,194,339), were strongly associated with poorer overall survival ($P = .01$; hazard ratio, >6) (Table 3). Regarding chromosomal gains, 23 of 35 gains (66%) also had an impact on the overall survival of patients with sCRC (Table 4); of these, gains of chromosome 7p11 (bp 54,502,479-57,882,571) and chromosome 13q31 (bp 90,792,026-90,867,535 and bp 92,522,499-92,673,304) had a stronger association with overall survival ($P = .01$; hazard ratio, >3) (Table 4).

Correlation Between the Chromosomal Alterations Detected by SNP Arrays and iFISH

To evaluate the consistency of chromosomal alterations identified by the SNP arrays, iFISH analyses were per-

formed in parallel for a total of 8 chromosomal regions. Overall, our results revealed a high degree of correlation (r^2 : mean, 0.61; range, 0.52-0.69) between both methods (Table 2).

Genes With an Adverse Impact on Patient Outcome

Genes coded within the chromosomal regions that exhibited a greater frequency of alteration in primary metastatic tumors versus primary nonmetastatic tumors, in association with an adverse impact on overall survival, included a total of 52 and 26 genes mapped in the deleted and gained chromosomal regions, respectively (Table 5). It is noteworthy that, almost 50% of the 52 deleted genes were previously associated with colorectal cancer ($n = 24$), and another 50% ($n = 24$) have been related to the metastatic process. Concerning genes involved in the gained chromosomal regions, it was reported previously that 15 of 26 genes were involved in colorectal cancer (eg glioblastoma amplified sequence [GBAS]) and/or the metastatic process (eg, podocalyxin-like [PODXL]). Figure 2 indicates that such deleted (eg genes coded at chromosome 18q21) or gained (eg genes coded at chromosomes 7p11 and 7q22) cancer-associated genes are directly related to well established genetic markers of sCRC, such as epidermal growth factor receptor (*EGFR*), the *SMAD* family of genes, and the deleted in colorectal carcinoma (*DCC*) gene.^{35,45,46} In addition, in the literature, it was reported

TABLE 3. Chromosomal Regions That Exhibited a Significantly Different Frequency of Copy Number Losses in Metastatic (n = 23) Versus Nonmetastatic (n = 26) Sporadic Colorectal Cancer Tumors Once Genotyped on the Affymetrix 500K Single Nucleotide Polymorphism-Array Platform and Their Impact on Overall Patient Survival^a

Lost Chromosomal Region (bp)	No. of SNPs	Mean Fold Change	Percentage of Losses			Median OS, mo			P	HR	P for HR
			Nonmetastatic Tumors, %	Metastatic Tumors, %	P	Cases With Chromosomal Loss	Cases Without Chromosomal Loss	P			
1p36 (20,557,292-20,618,072)	10	-0.74	27	65	.05	39	95	NS	2.3	NS	
1p33 (49,620,448-50,587,318)	67	-0.81	27	61	.05	40	93	.05	2.4	.05	
17p11 (13,916,156-14,521,723)	130	-1.20	31	87	.05	37	97	.02	3.2	.02	
18q11 (21,640,528-21,805,604)	36	-1.32	42	83	.04	39	97	NS	2.5	NS	
18q11 (22,569,906-26,178,219)	566	-1.50	38	83	.05	39	97	NS	2.5	NS	
18q11 (26,188,429-27,728,214)	311	-1.52	33	87	.05	37	97	.01	3.6	.02	
18q12 (27,969,319-29,628,991)	321	-1.68	31	87	.02	37	96	.005	4.1	.01	
18q12 (29,673,911-40,483,322)	1751	-1.56	38	87	.02	37	97	.01	3.6	.02	
18q12 (40,571,702-41,726,633)	349	-1.50	38	87	.03	37	97	.007	4.4	.02	
18q21 (42,119,752-44,304,862)	360	-1.43	42	91	.03	37	97	.007	4.3	.02	
18q21 (44,765,784-44,818,557)	8	-1.47	38	87	.04	37	96	.02	3.4	.03	
18q21 (44,879,066-45,497,910)	80	-1.55	42	91	.03	37	99	.001	6.8	.01	
18q21 (45,614,026-46,598,496)	308	-1.49	42	87	.04	37	97	.007	4.3	.02	
18q21 (46,912,256-53,316,730)	1395	-1.58	42	78	.04	39	97	.04	2.7	.05	
18q21 (53,658,175-55,508,632)	324	-1.32	42	78	.05	37	96	NS	2.1	NS	
18q21 (55,803,729-57,740,851)	364	-1.54	42	78	.05	37	97	.04	2.7	.05	
18q21 (57,744,781-58,390,267)	110	-1.51	42	93	.05	37	97	.04	2.7	.05	
18q21 (58,432,935-64,897,804)	830	-1.62	35	83	.02	37	97	.04	2.7	.05	
18q22 (64,908,767-70,255,162)	1210	-1.59	35	83	.03	37	97	.02	3.0	.04	
18q22 (70,331,521-70,892,013)	101	-1.62	42	91	.02	37	99	.01	4.0	.03	
18q22 (71,062,175-71,979,380)	313	-1.52	42	96	.04	39	101	.002	6.3	.01	
18q22 (71,991,789-72,194,339)	32	-1.53	42	100	.02	39	101	.002	6.3	.01	
18q23 (73,115,995-75,227,087)	289	-1.59	42	96	.03	37	99	.01	4.0	.03	

Abbreviations: bp, base pairs; HR, hazard ratio; NS, statistically nonsignificant ($P > .05$); OS, overall survival; SNPs, single nucleotide polymorphisms.

^aSurvival analysis of was performed using the Kaplan-Meier method, and the significance of differences between survival curves was assessed using a 1-sided log-rank test. The HR was computed as the exponential of the Cox regression model coefficient for each particular lost chromosomal region. The right censored observations were considered those observations in which the event of death had not occurred by the last contact, taken as the date of the censored observation.

previously that several of these genes exhibited deletion and loss of expression or gain and overexpression in metastatic sCRC (Fig. 2).

DISCUSSION

Most sCRC deaths are associated with metastatic dissemination of the primary tumor. New advances in genetic profiling of sCRCs suggest that primary tumors may already contain tumor cells with metastatic potential.⁴ Herein, we describe a comprehensive, detailed map of CNAs present in primary tumors from patients with metastatic versus nonmetastatic sCRC who were followed for a relatively long time, as assessed by high-resolution, 500-K SNP arrays and confirmed by iFISH studies. A high correlation also was observed between the SNP-array results and iFISH analyses performed on the same series of primary tumor samples with regard to the most commonly deleted (eg 17p and 18q) and gained (eg 7 and 13q) chromosomal regions, in line with in our previous

findings.^{5,47} To our knowledge, this is the most extensive study in which high-resolution SNP arrays have been used to define and compare the CNA profiles of both groups of sCRC tumors. Overall, we observed that there were many CNAs in common between the 2 groups of tumors, including losses of 3p, 4, 5q, 8p, 10q, 14q, 15q, and 22q and gains of 1q, 2p, 3q, 5p, 6q, 8q, 11p, and 20q. However, in addition to the CNAs that were common to both metastatic and nonmetastatic tumors, multiple CNAs occurred with greater frequency in primary tumors from patients with metastatic disease. These latter CNAs mainly involved regions lost at chromosomes 1p, 17p, and 18q together with regions of gain at chromosomes 7 and 13q.

Previous studies based on lower resolution cytogenetic analyses of primary tumors from patients with metastatic sCRC^{48,49} demonstrated frequent alterations of different regions at chromosomes 1p, 7, 13q, 17p, and 18q.^{48,50-53} Herein, we identified 58 different regions in

Original Article

TABLE 4. Chromosomal Regions That Exhibited a Significantly Different Frequency of Copy Number Gains in Metastatic (n = 23) Versus Nonmetastatic (n = 26) Sporadic Colorectal Cancer Tumors Once Genotyped on the Affymetrix 500K Single Nucleotide Polymorphism-Array Platform and Their Impact on Overall Patient Survival^a

Gained Chromosomal Region (bp)	No. of SNPs	Mean Fold Change	Percentage of Gains			Median OS, mo			P	HR	P for HR
			Nonmetastatic Tumors, %	Metastatic Tumors, %	P	No. With Chromosomal Gain	No. Without Chromosomal Gain	P			
7p22 (149,081-292,350)	36	1.43	27	52	.05	37	84	NS	2.0	NS	
7p22 (761,753-1,712,875)	76	1.69	27	52	.05	33	84	NS	2.4	NS	
7p22 (1,808,417-1,887,352)	9	1.48	27	57	.05	37	84	NS	2.1	NS	
7p22 (5,048,563-5,622,361)	43	1.41	31	61	.05	36	84	NS	1.9	NS	
7p22 (6,389,871-6,578,919)	29	1.50	31	61	.04	37	84	NS	1.9	NS	
7p22 (6,689,136-7,007,136)	8	1.58	27	57	.05	37	86	NS	2.2	NS	
7p15 (24,587,207-26,302,447)	47	1.15	23	61	.05	33	88	.05	2.5	.05	
7p14 (29,780,510-31,105,857)	221	1.09	23	61	.04	33	88	.05	2.5	.05	
7p13 (43,303,432-46,005,205)	366	1.28	19	57	.05	33	88	.05	2.5	.05	
7p12 (47,208,833-48,137,406)	194	1.16	23	57	.04	37	86	NS	2.0	NS	
7p12 (50,165,544-50,224,267)	16	1.09	27	61	.04	36	89	NS	2.2	NS	
7p12 (50,325,753-51,266,512)	238	1.16	23	57	.04	28	86	.03	2.7	.029	
7p11 (54,502,479-57,882,795)	416	1.20	19	52	.05	26	88	.01	3.1	.01	
7q11 (62,935,623-64,090,571)	126	1.01	15	48	.05	28	86	.04	2.6	.04	
7q11 (76,348,155-77,513,727)	77	0.82	19	48	.05	24	84	.02	3.0	.02	
7q22 (98,997,269-99,301,754)	27	1.03	19	48	.04	24	88	.01	3.3	.009	
7q32 (127,629,005-127,818,534)	44	0.91	23	52	.05	33	88	.04	2.6	.04	
7q32 (128,535,614-29,234,535)	77	0.93	23	52	.05	33	88	.04	2.6	.04	
7q32 (130,847,348-131,391,475)	147	0.84	19	52	.05	28	89	.02	3.0	.02	
7q33 (134,493,159-134,546,072)	26	0.98	19	52	.04	28	89	.02	3.0	.02	
7q34 (137,691,869-139,874,587)	289	0.95	23	48	.04	32	88	.04	2.6	.04	
7q34 (142,623,691-142,837,893)	25	1.23	19	52	.03	28	89	.02	3.0	.02	
13q22 (73,603,130-73,627,939)	10	1.89	35	74	.04	37	96	.01	3.2	.02	
13q22 (74,962,410-76,366,765)	42	1.47	31	74	.04	37	96	.03	2.8	.03	
13q31 (79,803,335-79,845,948)	11	1.65	27	74	.02	36	95	.01	3.2	.02	
13q31 (90,792,026-90,867,353)	7	2.03	27	74	.05	36	95	.008	3.6	.01	
13q31 (92,522,499-92,673,304)	31	1.62	23	70	.03	36	93	.007	3.5	.01	
13q31 (92,852,858-92,917,452)	23	1.59	23	65	.05	37	90	.02	2.9	.02	
13q32 (93,877,956-96,656,619)	486	1.46	23	65	.05	37	89	NS	2.4	NS	
13q32 (97,234,644-100,306,243)	577	1.52	27	65	.04	39	88	NS	2.1	NS	
13q33 (102,999,018-105,259,754)	569	1.46	27	61	.05	37	93	.05	2.4	.05	
13q33 (105,618,714-108,251,446)	697	1.54	27	65	.05	39	90	NS	2.2	NS	
13q33 (108,337,015-109,286,583)	204	1.53	27	65	.05	37	92	.03	2.7	.04	
13q34 (109,466,205-112,946,386)	609	1.58	19	61	.04	36	89	.04	2.6	.04	
13q34 (112,963,304-114,092,980)	113	1.85	15	52	.05	37	88	NS	2.1	NS	

Abbreviations: bp, base pairs; HR, hazard ratio; NS, statistically nonsignificant ($P > .05$); OS, overall survival; SNPs, single nucleotide polymorphisms.

^aSurvival analysis was performed using the Kaplan-Meier method, and the significance of differences between survival curves was assessed using a 1-sided log-rank test. The HR was computed as the exponential of the Cox regression model coefficient for each particular lost chromosomal region. The right censored observations were considered as those observations in which the event of death had not occurred by the last contact, taken as the date of the censored observation.

these same chromosomes that were altered preferentially in primary metastatic tumors versus primary nonmetastatic tumors. Furthermore, approximately 75% of these regions also were associated with poorer overall survival. Altogether, these observations point out the potential relevance of genes coded in these chromosomal regions in the development of sCRC metastasis.

Loss of chromosome 1p is well documented in sCRC.⁵² Allelic losses of chromosome 1p have been associated with increased tumor aggressiveness and reduced patient survival.^{50,54} In line with our findings, Ghadimi

et al observed a greater frequency of chromosome 1p32-ter loss in metastatic versus nonmetastatic cancer (61% vs 11% of patients) using comparative genomic hybridization.⁵³ Our results indicate a particularly high frequency of losses involving the 1p33 chromosomal locus, which may harbor relevant tumor suppressor genes like the embryonic lethal, abnormal vision (ELAV)-like neuron specific RNA binding protein 4 (*ELAVL4*) gene. Of note, Stawski et al recently reported significantly decreased expression of *ELAVL4* among male patients with meningiomas who carried deletions at DIS162, supporting the

TABLE 5. Chromosomal Regions Most Frequently Altered in Metastatic (n = 23) Versus Nonmetastatic (n = 26) Primary Sporadic Colorectal Cancer Tumors Genotyped on the Affymetrix 500K Single Nucleotide Polymorphism-Array Platform^a

Altered Chromosomal Region: bp	Region Length, bp	Chromosomal Band	Gene List ^b
Deletions			
Chr1: 49,620,448-50,587,318	966,870	1p33	ELAVL4
Chr17: 13,916,156-14,521,723	605,567	17p12	COX10
Chr18: 26,188,429-27,728,214	1,539,785	18q11.2	—
Chr18: 27,969,319-29,628,991	1,659,672	18q12.1	DSC3, DSC2, DSC1, DSG3, DSG2, TTR, RNF125
Chr18: 29,673,911-40,483,322	10,809,411	18q12.2	MAPRE2, ZNF24, GALNT1, SLC39A6, BRUNOL4, PIK3C3
Chr18: 40,571,702-41,726,633	1,154,931	18q12.3	SYT4
Chr18: 42,119,752-44,304,862	2,185,110	18q21.1	SETBP1, SLC14A2, ATP5A1, KIAA1632
Chr18: 44,765,784-44,818,557	52,773	18q21.1	—
Chr18: 44,879,066-45,497,910	618,844	18q21.1	SMAD2
Chr18: 45,614,026-46,598,496	984,470	18q21.1	SMAD7
Chr18: 46,912,256-53,316,730	6,404,474	18q21.2	LIPG, MBD1, ME2, SMAD4, DCC, MBD2, POLI, TCF4
Chr18: 55,803,729-57,740,851	1,937,122	18q21.32	MALT1, GRP, PMAIP1
Chr18: 57,744,781-58,390,267	645,486	18q21.32	—
Chr18: 58,432,935-64,897,804	6,464,869	18q21.33	PHLPP1, BCL2, SERPINB5, SERPINB12, SERPINB13, SERPINB4, SERPINB11, SERPINB3, SERPINB7, SERPINB2, SERPINB10, SERPINB8, CDH7, CDH19
Chr18: 64,908,767-70,255,162	5,346,395	18q22.2	CD226, SOCS6
Chr18: 70,331,521-70,892,013	560,492	18q22.3	—
Chr18: 71,062,175-71,979,380	917,205	18q22.3	CYB5A
Chr18: 71,991,789-72,194,339	202,550	18q22.3	CNDP2
Chr18: 73,115,995-75,227,087	2,111,092	18q23	GALR1
Gains			
Chr7: 24,587,207-26,302,447	1,715,240	7p15.3	DFNA5, NFE2L3, HNRNPA2B1
Chr7: 29,780,510-31,105,857	1,325,347	7p14.3	SCRN1, FKBP14, PLEKHA8, NOD1, GARS, AQP1, GHRHR, ADCYAP1R1
Chr7: 43,303,432-46,005,205	2,701,773	7p13	—
Chr7: 50,325,753-51,266,512	940,759	7p12.1	IKZF1, DDC, GRB10, COBL
Chr7: 54,502,479-57,882,795	3,380,316	7p11.2	SEC61G, EGFR, LANCL2, VOPP1, PSPH, GBAS
Chr7: 62,935,623-64,090,571	1,154,948	7q11.21	—
Chr7: 76,348,155-77,513,727	1,165,572	7q11.23	—
Chr7: 98,997,269-99,301,754	304,485	7q22.1	CYP3A5, CYP3A7
Chr7: 127,629,005-127,818,534	189,529	7q32.1	—
Chr7: 128,535,614-129,234,535	698,921	7q32.1	—
Chr7: 130,847,348-131,391,475	544,127	7q32.3	PODXL
Chr7: 134,493,159-134,546,072	52,913	7q33	—
Chr7: 137,691,869-139,874,587	2,182,718	7q34	—
Chr7: 142,623,691-142,837,893	214,202	7q34	TRPV5, KEL
Chr13: 73,603,130-73,627,939	24,809	13q22.1	—
Chr13: 74,962,410-76,366,765	1,404,355	13q22.2	—
Chr13: 79,803,335-79,845,948	42,613	13q31.1	—
Chr13: 90,792,026-90,867,353	75,327	13q31.3	—
Chr13: 92,522,499-92,673,304	150,805	13q31.3	—
Chr13: 92,852,858-92,917,452	64,594	13q31.3	—
Chr13: 102,999,018-105,259,754	2,260,736	13q33.1	—
Chr13: 108,337,015-109,286,583	949,568	13q33.3	—
Chr13: 109,466,205-112,946,386	3,480,181	13q34	—

Abbreviations: bp, base pairs; Chr, chromosome.

^aOnly cancer-associated genes coded in the altered chromosomal regions that had an impact on overall survival are listed in the table.^bGenes that have been associated with colorectal cancer are indicated in bold, and genes commonly associated with the metastatic process are underlined.

Original Article

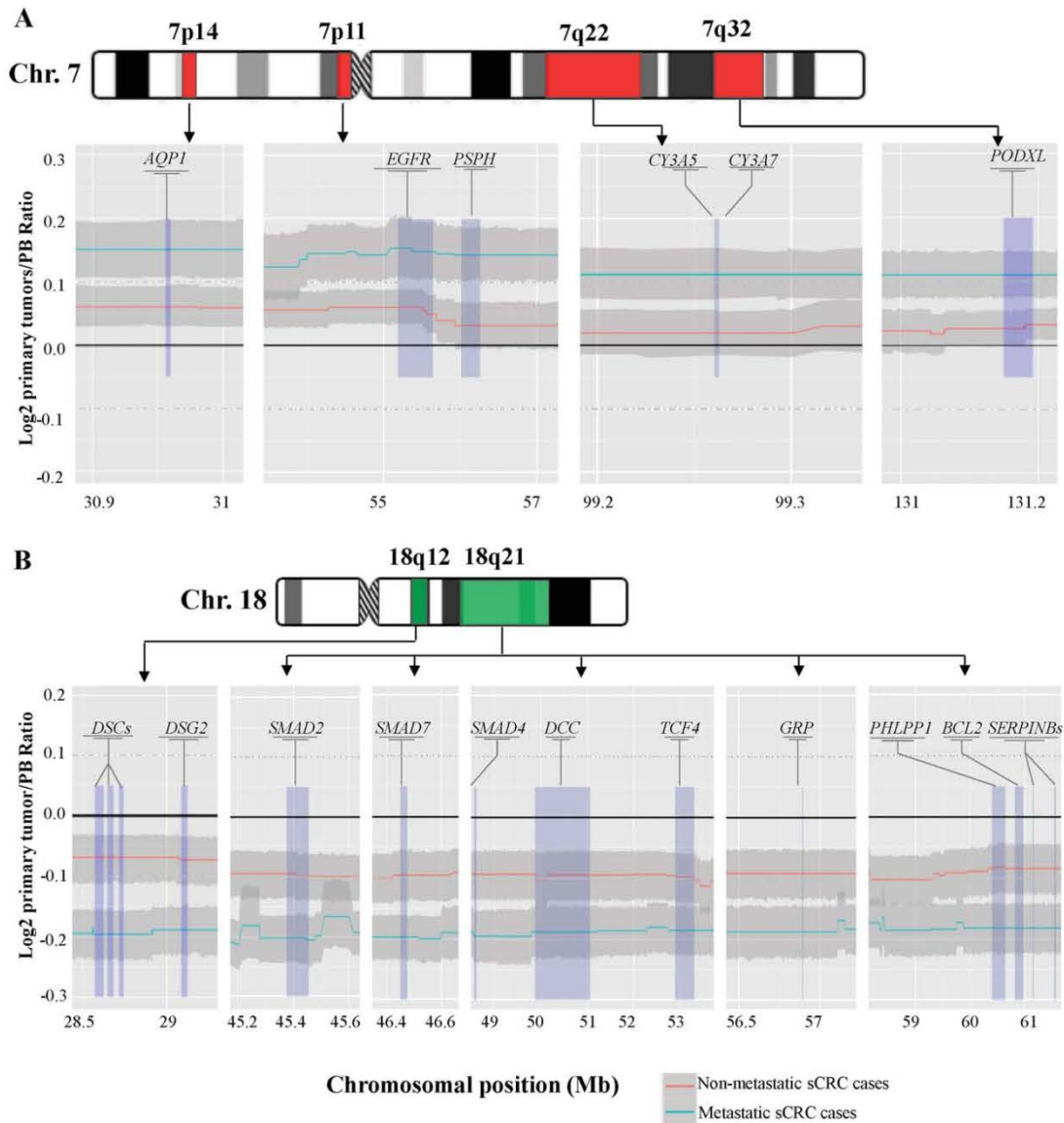


Figure 2. Copy number changes detected in primary tumors from patients with metastatic (n = 23) versus nonmetastatic (n = 26) sporadic colorectal cancer (sCRC) were genotyped on the Affymetrix 500-K single nucleotide polymorphism (SNP)-array platform corresponding to (A) gains of the 7p11 and 7q22 chromosome (Chr.) 7 regions and (B) chromosome 18q21 losses. In both A and B, summary plots illustrating the mean (smoothed) fluorescence intensity log₂ values of primary tumor/normal peripheral blood (PB) ratios for the chromosomal regions that had copy number (A) gains and (B) losses are displayed as red lines for non-metastatic tumors and blue lines for metastatic tumors (ie, plotted above zero values in the x-axis); confidence intervals are indicated as background gray areas. Genes coded at the 7p14.3 (*AQP1*^{11,12}), 7p11.2 (*EGFR*^{13,14} and *PSPH*^{15,16}), 7q22.1 (*CYP3A5* and *CYP3A7*^{17,18}), 7q32.3 (*PODXL*¹⁹⁻²¹), 18q12.1 (*DSC3*²²⁻²⁴, *DSC2*^{22,25}, *DSC1*^{22,24} and *DSG2*²⁶), 18q21.1 (*SMAD2*^{27,28} and *SMAD7*²⁹), 18q21.2 (*SMAD4*³⁰⁻³³, *DCC*³²⁻³⁵ and *TCF4*³⁶⁻³⁸), 18q21.32 (*GRP*^{39,40}), and 18q21.33 (*PHLPP1*^{16,41}, *BCL2*^{42,43}, *SERPINB5*⁴⁴ and *SERPINB2*⁴⁴) chromosomal regions that were previously associated with sCRC tumor metastases are listed in italics. Red arrows represent gains and overexpression, and green arrows represent deletion and losses of expression of a given gene, as described in published data sets.

hypothesis that *ELAVL4* may act as a tumor suppressor gene in meningiomas.⁵⁵

In line with our previous findings using iFISH,⁶ del(17p) also was observed with significantly greater frequency among patients with metastatic tumors versus patients with nonmetastatic tumors and was associated with a poorer prognosis. These results are also in line with the observations of other groups that evaluated the association between del(17p) and outcome in patients with stage II and stage III sCRC⁵⁶; however, apart from tumor protein 53 (*TP53*), the specific relevant genes involved remain to be identified.

Del(18q) has long been observed in sCRC using a broad panel of techniques that vary from conventional cytogenetics⁵⁷ and iFISH⁴ to comparative genomic hybridization, comparative genomic hybridization arrays, and SNP arrays.⁴⁷ Within the long arm of chromosome 18, the 18q21 cytoband was the most frequently altered (range, 50%-70% of CRCs) in those studies.^{4,47,57} This region contains both the *DCC* and *SMAD* genes, which are well established genetic biomarkers of sCRC and typically are associated with advanced disease. Currently, it is well established that *DCC* plays a role in inducing apoptosis, whereas *SMAD* family member 4 (*SMAD4* [*DPC4*]) encodes intracellular transducers of the transforming growth factor- β apoptosis pathway.^{35,58,59} It is worth noting that deletions at other specific subregions of chromosome 18q also have been associated with a poor prognosis in advanced sCRC.⁶⁰ Thus, Liu et al observed that loss of 18q12-qter is an independent prognostic marker that is detected more frequently in stage III/IV (vs stage I) tumors.⁶¹ Similarly, Poulgiannis et al used DNA microarrays to identify DNA copy number losses at 18q12.2 involving a single gene—ie, the *BRUNOL4* (Bruno-like 4 splicing factor) gene—as an independent, adverse prognostic factor.⁶² In addition to the *BRUNOL4* gene, we also observed 5 other recurrently altered genes in this same chromosomal region: 2 of those genes were associated previously with sCRC (eg microtubule-associated protein RP/EB family member 2 [*MAPRE2*] and zinc finger protein 24 [*ZNF24*]), another gene was associated recurrently with the metastatic process (eg phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3 [*PIK3C3*]), and the remaining 2 genes were related previously to other malignancies like ovarian cancer (UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine, polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 [*GALNT1*])⁶³ and esophageal squamous cell carcinoma (solute carrier 14-urea transporter, member 2 [*SLC14A2*]).⁶⁴ It is noteworthy that the greater number of 18q22 genes identified in our series versus that reported

by Poulgiannis et al potentially may have a technical explanation because of the use of a higher resolution array (down to 2.5 kb vs 1 Mb) in the 2 series. In addition, the greater number of genes identified also may be related to the loss of other genes that are codeleted in chromosome 18q12. In line with this hypothesis, Knosel et al reported an association between del(18q23) observed with comparative genomic hybridization and both lymphatic and liver metastasis.⁶⁵ Storojeva et al used real-time quantitative polymerase chain reaction analysis to establish that del(18q22) involving DNAX accessory molecule 1 (*DNAM-1*), suppressor of cytokine signaling 6 (*SOCS6*), and α -7 nicotinic receptor (*ACHR-7*) also was associated with a worse prognosis among patients with sCRC,⁶⁶ and we also identified other deleted regions at chromosome 18q (ie, 18q11, 18q12, 18q21, 18q22, and 18q23) that were associated with shorter overall survival.

It is noteworthy that we identified 3 regions of gain in chromosome 7 associated with poor outcome and metastasis: the 7p11, 7q22 and 7q23 chromosomal regions. The former encodes a well established oncogene, ie, the *EGFR* gene, which is involved in cell proliferation with antiapoptotic properties.^{46,67} It is noteworthy that different studies have reported coamplification with *EGFR* of several other adjacent genes, such as the SEC γ subunit (*SEC61G*) and LanC lantibiotic synthase component C-like 2 (*LANCL2*) genes in breast cancer⁶⁸ and the *LANCL2*, vesicular-overexpressed in cancer prosurvival protein 1 (*VOPPI*), phosphoserine phosphatase (*PSPH*), and glioblastoma amplified sequence (*GBAS*) genes in glioblastoma.⁶⁹ In turn, the 7q22 chromosomal region contains the cytochrome p450 family 3, subfamily A, polypeptide 5 (*CYP3A5*) and *CYP3A7* genes, which encode for the P450 enzymes involved in drug metabolism. In line with our findings, overexpression of the *CYP3A5* and *CYP3A7* genes has been detected recurrently in primary sCRC tumors¹⁷ and metastatic prostate cancer.⁷⁰ Finally, special attention should be paid to the *PODXL* gene coded at chromosome 7q32, because *PODXL* is involved in cell adhesion, which has been associated with the metastatic process⁷¹ and also with a poor prognosis among patients with sCRC.²¹

With regard to chromosome 13q, in the current study, we identified 9 regions in which 13q gains were associated with metastatic tumors and poorer overall survival. However, we did not identify any coded genes in these regions that were related previously with the oncogenic process; for instance, a clear association between gains of these chromosomal regions and both tumor

Original Article

metastasis and a poor prognosis have been reported previously by our group and others.^{5,47,62}

In summary, in this study, we used high-resolution SNP-array techniques to describe in detail the genetic alterations most frequently associated with metastatic sCRC and the potential genes involved. Further gene expression profiling and functional studies focused on such genes encoded at chromosomes 1p, 7, 13q, 17p, and 18q and their potential interactions are needed to establish their precise pathogenic role in the metastatic process in patients with sCRC.

FUNDING SUPPORT

This work was supported in part by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain (PI12-02053-FIS); Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain (BIO-SA02-13); RTICC (RD12-0020-0035-FEDER, RD12-0036-0048-FEDER); Fundación Memoria de Don Samuel Solórzano Barruso, Salamanca, Spain; and Caja de Burgos (Obra Social), Burgos. Dr. Sayagués is supported by a grant (CP05-00321) from the ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

The authors made no disclosures.

REFERENCES

- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58:71-96.
- Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet.* 2005;365:153-165.
- Abdel-Misih SR, Schmidt CR, Bloomston PM. Update and review of the multidisciplinary management of stage IV colorectal cancer with liver metastases [serial online]. *World J Surg Oncol.* 2009;7:72.
- Sayagues JM, Abad Mdel M, Melchor HB, et al. Intratumoural cytogenetic heterogeneity of sporadic colorectal carcinomas suggests several pathways to liver metastasis. *J Pathol.* 2010;221:308-319.
- Munoz-Bellvis L, Fontanillo C, Gonzalez-Gonzalez 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;25:590-601.
- Gonzalez-Gonzalez M, Munoz-Bellvis L, Mackintosh C, et al. Prognostic impact of del(17p) and del(22q) as assessed by interphase FISH in sporadic colorectal carcinomas [serial online]. *PLoS One.* 2012;7:e42683.
- World Health Organization. WHO Classification of Tumours. Vol3, 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2010.
- Bengtsson H, Wirapati P, Speed TP. A single-array preprocessing method for estimating full-resolution raw copy numbers from all Affymetrix genotyping arrays including GenomeWideSNP 5 & 6. *Bioinformatics.* 2009;25:2149-2156.
- Venkatraman ES, Olshen AB. A faster circular binary segmentation algorithm for the analysis of array CGH data. *Bioinformatics.* 2007;23:657-663.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res.* 2001;125:279-284.
- Jiang Y. Aquaporin-1 activity of plasma membrane affects HT20 colon cancer cell migration. *IUBMB Life.* 2009;61:1001-2009.
- Mobasher A, Airley R, Hewitt SM, Marples D. Heterogeneous expression of the aquaporin 1 (AQP1) water channel in tumors of the prostate, breast, ovary, colon and lung: a study using high density multiple human tumor tissue microarrays. *Int J Oncol.* 2005;26:1149-1158.
- Pantaleo MA, Astolfi A, Nannini M, et al. Gene expression profiling of liver metastases from colorectal cancer as potential basis for treatment choice. *Br J Cancer.* 2008;99:1729-1734.
- Dulak AM, Schumacher SE, van Lieshout J, et al. Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res.* 2012;72:4383-4393.
- Jovov B, Araujo-Perez F, Sigel CS, et al. Differential gene expression between African American and European American colorectal cancer patients [serial online]. *PLoS One.* 2012;7:e30168.
- Liu J, Weiss HL, Rychahou P, Jackson LN, Evers BM, Gao T. Loss of PHLPP expression in colon cancer: role in proliferation and tumorigenesis. *Oncogene.* 2009;28:994-1004.
- Kumarakulasingham M, Rooney PH, Dundas SR, et al. Cytochrome p450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3758-3765.
- Canaparo R, Nordmark A, Finnstrom N, et al. Expression of cytochromes P450 3A and P-glycoprotein in human large intestine in paired tumour and normal samples. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;100:240-248.
- Barderas R, Mendes M, Torres S, et al. In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12:1602-1620.
- Larsson AH, Nodin B, Syk I, et al. Podocalyxin-like protein expression in primary colorectal cancer and synchronous lymph node metastases [serial online]. *Diagn Pathol.* 2013;8:109.
- Larsson A, Fridberg M, Gaber A, et al. Validation of podocalyxin-like protein as a biomarker of poor prognosis in colorectal cancer [serial online]. *BMC Cancer.* 2012;12:282.
- Cui T, Chen Y, Yang L, et al. DSC3 expression is regulated by p53, and methylation of DSC3 DNA is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2011;104:1013-1019.
- Schule S, Neuhauser C, Rauchfuss F, Knosel T, Settmacher U, Altendorf-Hofmann A. The influence of desmocollin 1-3 expression on prognosis after curative resection of colorectal liver metastases. *Int J Colorectal Dis.* 2014;29:9-14.
- Knosel T, Chen Y, Hotovy S, Settmacher U, Altendorf-Hofmann A, Petersen I. Loss of desmocollin 1-3 and homeobox genes PITX1 and CDX2 are associated with tumor progression and survival in colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2012;27:1391-1399.
- Kolegraft K, Nava P, Helms MN, Parkos CA, Nusrat A. Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of Akt/beta-catenin signaling. *Mol Biol Cell.* 2011;22:1121-1134.
- Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K. Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma. *Eur J Cancer.* 2006;42:2397-2403.
- Hamamoto T, Beppu H, Okada H, et al. Compound disruption of smad2 accelerates malignant progression of intestinal tumors in apc knockout mice. *Cancer Res.* 2002;62:5955-5961.
- Lips EH, van Eijk R, de Graaf EJ, et al. Integrating chromosomal aberrations and gene expression profiles to dissect rectal tumorigenesis [serial online]. *BMC Cancer.* 2008;8:314.
- Saito N, Kameoka S, Furukawa R. Gene profile analysis of colorectal cancer cell lines by cDNA macroarray. *Oncol Rep.* 2007;17:1061-1065.
- Kloosterman WP, Hoogstraal M, Paling O, et al. Chromothripsis is a common mechanism driving genomic rearrangements in primary and metastatic colorectal cancer [serial online]. *Genome Biol.* 2011;12:R103.
- Salovaara R, Roth S, Loukola A, et al. Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut.* 2002;51:56-59.
- Tarafa G, Villanueva A, Farre L, et al. DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene.* 2000;19:546-555.
- Bacolod MD, Barany F. Molecular profiling of colon tumors: the search for clinically relevant biomarkers of progression, prognosis, therapeutics, and predisposition. *Ann Surg Oncol.* 2011;18:3694-3700.

34. Cho KR, Oliner JD, Simons JW, et al. The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics*. 1994;19:525-531.
35. Aschele C, Debernardi D, Lonardi S, et al. Deleted in colon cancer protein expression in colorectal cancer metastases: a major predictor of survival in patients with unresectable metastatic disease receiving palliative fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2004;22:3758-3765.
36. Fang YJ, Lu ZH, Wang GQ, et al. Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009;24:875-884.
37. Mokry M, Hatzis P, Schuijers J, et al. Integrated genome-wide analysis of transcription factor occupancy, RNA polymerase II binding and steady-state RNA levels identify differentially regulated functional gene classes. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:148-158.
38. Herbst A, Bommer GT, Kriegl L, et al. ITF-2 is disrupted via allelic loss of chromosome 18q21, and ITF-2B expression is lost at the adenoma-carcinoma transition. *Gastroenterology*. 2009;137:639-648, 648.e1-e9.
39. Rivera CA, Ahlberg NC, Taglia L, Kumar M, Blunier A, Benya RV. Expression of GRP and its receptor is associated with improved survival in patients with colon cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26:663-671.
40. Glover S, Nathaniel R, Shaker L, et al. Transient up-regulation of GRP and its receptor critically regulate colon cancer cell motility during remodeling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G1274-G1282.
41. Wang Z, Shu H, Li G, et al. Loss expression of PHLPP1 correlates with lymph node metastasis and exhibits a poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2013;108:427-432.
42. Deichman GI, Dyakova NA, Matveeva VA, Kashkina LM. Alternative production of Bcl-2 and Bax by tumor cells determines the rates of in vivo tumor progression: suggested mechanisms. *J Cell Biochem*. 2007;101:1148-1164.
43. Torsello A, Garufi C, Cosimelli M, et al. P53 and bcl-2 in colorectal cancer arising in patients under 40 years of age: distribution and prognostic relevance. *Eur J Cancer*. 2008;44:1217-1222.
44. Yang JL, Seetoo D, Wang Y, et al. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets. *Int J Cancer*. 2000;89:431-439.
45. Halder SK, Rachakonda G, Deane NG, Datta PK. Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008;99:957-965.
46. Lu Y, Jingyan G, Baorong S, Peng J, Xu Y, Cai S. Expression of EGFR, Her2 predict lymph node metastasis (LNM)-associated metastasis in colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2012;11:219-226.
47. Sayagues JM, Fontanillo C, Abad Mdel M, et al. Mapping of genetic abnormalities of primary tumours from metastatic CRC by high-resolution SNP arrays [serial online]. *PLoS One*. 2010;5:e13752.
48. Diep CB, Parada LA, Teixeira MR, et al. Genetic profiling of colorectal cancer liver metastases by combined comparative genomic hybridization and G-banding analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;36:189-197.
49. Camps J, Grade M, Nguyen QT, et al. Chromosomal breakpoints in primary colon cancer cluster at sites of structural variants in the genome. *Cancer Res*. 2008;68:1284-1295.
50. Knosel T, Schluns K, Stein U, et al. Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia*. 2004;6:23-28.
51. Tanaka T, Watanabe T, Kitayama J, et al. Chromosome 18q deletion as a novel molecular predictor for colorectal cancer with simultaneous hepatic metastasis. *Diagn Mol Pathol*. 2009;18:219-225.
52. Payne CM, Crowley-Skillcorn C, Bernstein C, Holubec H, Bernstein H. Molecular and cellular pathways associated with chromosome 1p deletions during colon carcinogenesis. *Clin Exp Gastroenterol*. 2011;4:75-119.
53. Ghadimi BM, Grade M, Monkemeyer C, et al. Distinct chromosomal profiles in metastasizing and non-metastasizing colorectal carcinomas. *Cell Oncol*. 2006;28:273-281.
54. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G, et al. Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. *Gastroenterology*. 1997;113:761-766.
55. Stawski R, Piaskowski S, Stoczynska-Fidelus E, et al. Reduced expression of ELAVL4 in male meningioma patients. *Brain Tumor Pathol*. 2013;30:160-166.
56. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, et al. Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30:2256-2264.
57. Camps J, Morales C, Prat E, et al. Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer*. 2004;110:869-874.
58. Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, et al. SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2606-2611.
59. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*. 1998;395:801-804.
60. Postma C, Koopman M, Buffart TE, et al. DNA copy number profiles of primary tumors as predictors of response to chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009;20:1048-1056.
61. Liu XP, Kawauchi S, Oga A, et al. Chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep*. 2007;17:261-267.
62. Poulgiannis G, Ichimura K, Hamoudi RA, et al. Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. *J Pathol*. 2010;220:338-347.
63. Phelan CM, Tsai YY, Goode EL, et al. Polymorphism in the GALNT1 gene and epithelial ovarian cancer in non-Hispanic white women: the Ovarian Cancer Association Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:600-604.
64. Wu C, Li D, Jia W, et al. Genome-wide association study identifies common variants in SLC39A6 associated with length of survival in esophageal squamous-cell carcinoma. *Nat Genet*. 2013;45:632-638.
65. Knosel T, Schluns K, Stein U, et al. Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients. *Histopathology*. 2003;43:323-331.
66. Storojeva I, Boulay JL, Ballabeni P, et al. Prognostic and predictive relevance of DNAM-1, SOCS6 and CADH-7 genes on chromosome 18q in colorectal cancer. *Oncology*. 2005;68:246-255.
67. Flora M, Piana S, Bassano C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number in colorectal adenoma-carcinoma progression. *Cancer Genet*. 2012;205:630-635.
68. Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MB, et al. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *J Pathol*. 2006;209:445-453.
69. Crespo I, Tao H, Nieto AB, et al. Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels [serial online]. *PLoS One*. 2012;7:e46088.
70. Mitsiades N, Sung CC, Schultz N, et al. Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors. *Cancer Res*. 2012;72:6142-6152.
71. Meng X, Ezzati P, Wilkins JA. Requirement of podocalyxin in TGF-beta induced epithelial mesenchymal transition [serial online]. *PLoS One*. 2011;6:e18715.

**Asociación entre el perfil citogenético de la célula
tumoral y la respuesta al tratamiento preoperatorio en
cáncer de recto localmente avanzado**

3

María González-González¹, Jacinto García², José Antonio Alcazar²,
María Laura Gutiérrez¹, Luis Miguel González², Oscar Bengoechea³,
María Mar Abad³, Ángel Santos-Briz³, Oscar Blanco³,
Manuela Martín⁴, Ana Rodríguez⁵, Manuel Fuentes¹,
Luis Muñoz-Bellvis², Alberto Orfao^{1*} y José M. Sayagues^{1*}.

1 Servicio General de Citometría-NUCLEUS, Departamento de Medicina y Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Universidad de Salamanca

2 Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática, Departamento de Cirugía, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

3 Departamento de Patología, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

4 Servicio de Radio-diagnóstico, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

5 Departamento de Oncología Radioterápica, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL

Medicine (Baltimore). 2014 Nov;93(26):e153.

doi: 10.1097/MD.000000000000153.

Introducción. La radioquimioterapia (RQT) neoadyuvante administrada antes de la cirugía a pacientes con carcinoma rectal localmente avanzado ha demostrado ser eficaz en un porcentaje significativo de casos. Los efectos beneficiosos de la RQT incluyen la regresión del tumor a estadios menos avanzados en el momento de la cirugía lo que permite realizar procedimientos quirúrgicos menos invasivos y preservar los esfínteres con la consiguiente reducción de las complicaciones post-operatorias, además de un menor riesgo de recaída y una mejor calidad de vida de los pacientes. No obstante lo anterior, la respuesta de los tumores de recto al tratamiento neoadyuvante sigue siendo muy variable, observándose desde respuestas completas a ausencia de respuesta,, e incluso, progresión tumoral en un pequeño porcentaje de casos. Actualmente, no existe un método consensuado sobre cómo evaluar la respuesta al tratamiento neoadyuvante; sin embargo, tanto la clasificación TNM como el sistema de regresión Dworak, constituyen métodos comúnmente utilizados para evaluar la respuesta a este tipo de tratamiento. En los últimos años, se han referido en la literatura resultados contradictorios en cuanto a la identificación de marcadores predictivos de la respuesta a la terapia neoadyuvante en carcinoma de recto; entre los marcadores identificados se encuentran multitud de alteraciones cromosómicas que, según algunos autores, permiten discriminar entre pacientes sensibles y tumores resistentes al tratamiento. Sin embargo, las técnicas utilizadas para la detección de estas alteraciones genéticas no proporcionan información sobre la posible heterogeneidad genética de las células tumorales del cáncer de recto a nivel intra-tumoral. Dicha heterogeneidad, podría ser particularmente relevante cuando coexisten diferentes clones en distinta frecuencia en el tumor, y solo una parte de dichos clones tumorales son sensibles a la RQT administrada antes de la cirugía.

Objetivo. En este trabajo nos propusimos como primer objetivo identificar las alteraciones cromosómicas más frecuentes en el carcinoma rectal localmente avanzado, mediante el estudio de muestra tumorales pareadas obtenidas de forma previa al tratamiento y después del mismo empleando técnica de hibridación *in situ* fluorescente sobre núcleos interfásicos (*iFISH*); con ello pudimos establecer las vías de evolución clonal coexistentes a nivel intra-tumoral. A continuación, nuestro segundo objetivo se centró en determinar

la posible asociación entre estos perfiles de evolución clonal y la respuesta vs. resistencia a la RQT administrada antes de la cirugía, evaluada según el sistema regresión tumoral de Dworak.

Pacientes, materiales y métodos. En conjunto, analizamos muestras tumorales de 45 pacientes diagnosticados de cáncer de recto localmente avanzado entre septiembre de 2007 y mayo de 2011. Antes de que se administrara el tratamiento, los pacientes fueron estadiados según la clasificación uTNM utilizando técnicas de imagen. En todos los casos, la RQT administrada de forma previa a la resección quirúrgica del tumor consistió en radioterapia de larga duración con 50.4 Gy fraccionados en 25 a 28 sesiones, y capetacitabina (800-825 mg/m²). El grado de respuesta tumoral a la RQT se estableció siguiendo los criterios de Dworak, que permitían agrupar a los de pacientes e casos con respuesta de grado 0 (ausencia de regresión tumoral) hasta grado 4 (regresión completa del tumor). En conjunto, analizamos 76 muestras de tejido tumoral primario mediante técnicas de *i*FISH: 45 muestras de biopsia de tejido tumoral tomadas antes de la administración de cualquier tipo de terapia, y 31 muestras tumorales pareadas post-tratamiento. Las muestras post-tratamiento de los 14 casos restantes correspondían a muestras de 6 casos que presentaban regresión completa del tumor tras la RQT y 8 pacientes en los que no disponíamos de tejido sobrante, una vez se realizaron los procedimientos diagnósticos requeridos. Las muestras se fijaron y tiñeron con hematoxilina-eosina para confirmar la presencia de células tumorales y evaluar la calidad de las mismas, además de seleccionar las regiones del tejido idóneas para los análisis de *i*FISH. Para el análisis de las alteraciones cromosómicas presentes a nivel de células individuales del tejido tumoral se emplearon un total de 51 sondas específicas dirigidas frente las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas en el carcinoma rectal, utilizando marcajes triples. Para evaluar el valor estadístico de las diferencias observadas entre grupos de tumores/pacientes empleamos los test de la T de Student y de la U de Mann-Whitney para variables continuas, según mostrasen o no una distribución normal, respectivamente; para las variables cualitativas, se aplicaron los test de χ^2 y de McNemar para grupos pareados. El umbral de significación estadística se estableció para probabilidades de error (valores de p) $\leq 0,05$.

Resultados. La mayoría de las muestras tumorales analizadas mostraron cariotipos complejos con múltiples anomalías numéricas y/o estructurales, que implicaban numerosas regiones cromosómicas concretas. En términos globales, la mayoría de los tumores analizados mostraban ganancia de múltiples regiones cromosómicas reflejándose la existencia de cariotipos poliploides, siendo de todas las ganancias detectadas, las polisomías de los cromosomas 2 (58%), 3 (56%), 6 (47%), 7 (56%), 12 (47%), 13 (75%) y 20 (87%) las más frecuentes. Además con frecuencia, se observaron también ganancias de las regiones cromosómicas 1q (49%) y 13q (75%), y amplificación de las regiones cromosómicas 8q (38%) y 20q (47%). A su vez, las pérdidas cromosómicas más frecuentes correspondieron a pérdidas de regiones cromosómicas localizadas a nivel de 1p (44%), 8p (53%), 17p (47%) y 18q (38%). El análisis de las alteraciones genéticas presentes en las muestras obtenidas tras la administración de RQT y la resección quirúrgica del tumor (n=31) mostró en general un perfil citogenético similar al de las muestras analizadas de forma previa a la RQT. Sin embargo, existían también diferencias significativas entre las muestras pre-y post-cirugía, en el número de copias detectadas para los cromosomas 8q ($p=0,004$), 13q ($p=0,003$), y 20q ($p=0,002$). El análisis detallado del patrón de alteraciones cromosómicas de las células tumorales individuales (a nivel intra-tumoral) reveló la presencia de al menos 2 clones de células tumorales distintos en 31 de los 45 casos analizados (69%). En estos casos, los clones de células tumorales ancestrales se caracterizaban por mostrar alteraciones cromosómicas comunes a todas las células tumorales de una proporción significativa de pacientes e incluían pérdidas del cromosoma 8p (51% de los casos) y ganancias de 8q, 13q y 20q (60%). Más interesante aún fue la distinta distribución de las alteraciones cromosómicas observadas en las regiones 1p, 1q, 11p, 12p y 17p en los clones ancestrales de las células tumorales pertenecientes a las muestras pre-tratamiento de los pacientes con adenocarcinoma rectal localmente avanzado sensibles vs. resistentes a la RQT. Así, al agrupar a los pacientes según el grado de respuesta a la RQT neoadyuvante, encontramos una asociación significativa entre la respuesta al tratamiento y tumores que presentaban alteraciones de los cromosomas 1p ($p=0,0002$), 1q ($p=0,03$), 11p ($p=0,04$), 12p ($p=0,04$) y 17p ($p=0,03$). Así, los pacientes cuyos clones de células tumorales ancestrales presentaban del(17p) de forma aislada, (2/17, 12%) o en combinación con del(1p) (2/17, 12%) o ganancias de los cromosomas 11 y 12 (4/17, 24%), de forma característica se asociaban con resistencia al tratamiento; por el contrario, la del(1p) estaba presente

como alteración primaria característica del clon de células tumorales ancestrales en 9 de los 10 casos que presentaban respuesta (G3 y G4) al tratamiento, constituyendo esta la única alteración cromosómica presente en el clon ancestral de células tumorales, o estando presente en combinación con ganancias de los cromosomas 1q, 11p y 12p (5/10; 50%).

Conclusiones. En este trabajo se demuestra la existencia de una asociación significativa entre el perfil citogenético del clon ancestral de células tumorales de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado y la respuesta a la RQT administrada antes de la cirugía, constituyendo la presencia de la del(17p) un marcador de resistencia al tratamiento y la del(1p) un parámetro asociado a mayor sensibilidad a la RQT.

OPEN

Association Between the Cytogenetic Profile of Tumor Cells and Response to Preoperative Radiochemotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer

María González-González, MSc, Jacinto Garcia, MD, PhD, José A. Alcazar, MD, PhD, María L. Gutiérrez, MSc, Luis M. González, MD, Oscar Bengoechea, MD, PhD, María M. Abad, MD, PhD, Angel Santos-Briz, MD, PhD, Oscar Blanco, MD, PhD, Manuela Martín, MD, PhD, Ana Rodríguez, MD, PhD, Manuel Fuentes, PhD, Luis Muñoz-Bellvis, MD, PhD, Alberto Orfao, MD, PhD, and Jose M. Sayagues, PhD

Abstract: Neoadjuvant radiochemotherapy to locally advanced rectal carcinoma patients has proven efficient in a high percentage of cases. Despite this, some patients show nonresponse or even disease progression. Recent studies suggest that different genetic alterations may be associated with sensitivity versus resistance of rectal cancer tumor cells to neoadjuvant therapy. We investigated the relationship between intratumoral pathways of clonal evolution as assessed by interphase fluorescence in situ hybridization (51 different probes) and response to neoadjuvant radiochemotherapy, evaluated by Dworak criteria in 45 rectal cancer tumors before ($n=45$) and after ($n=31$) treatment. Losses of chromosomes 1p (44%), 8p (53%), 17p (47%), and 18q (38%) and gains of 1q (49%) and 13q (75%) as well as amplification of 8q (38%) and 20q (47%) chromosomal regions were those specific alterations found at higher frequencies. Significant association ($P < 0.05$) was found between alteration of 1p, 1q, 11p, 12p, and 17p chromosomal regions and degree of response to neoadjuvant therapy. A clear association was observed between cytogenetic profile of the ancestral tumor cell clone and response to radiochemotherapy; cases presenting with del(17p) showed a poor response to neoadjuvant treatment ($P=0.03$), whereas presence of del(1p) was more frequently observed in responder patients ($P=0.0002$). Moreover, a significantly higher number of

copies of chromosomes 8q ($P=0.004$), 13q ($P=0.003$), and 20q ($P=0.002$) were found after therapy versus paired pretreatment rectal cancer samples. Our results point out the existence of an association between tumor cytogenetics and response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. Further studies in larger series of patients are necessary to confirm our results.

(*Medicine* 93(26):e153)

Abbreviations: 5-FU = 5-fluorouracile, APR = abdominoperineal resection, AR = anterior resection, CEA = carcinoembryonic antigen, R2 = distal and circumferential verges with tumor cells, R1 = distal or circumferential verges with tumor cells, G0 = evaluation of response was performed by the Dworak regression grading system (grade 0, no regression), G1 = grade 1, dominant tumor mass with obvious fibrosis and/or vasculopathy, G2 = grade 2, dominantly fibrotic changes with few tumor cells or groups of tumor cells, G3 = grade 3, very few tumor cells in a fibrotic tissue with or without mucous substance, G4 = grade 4, no tumor cells, only fibrotic mass (total regression or response), *i*FISH = interphase fluorescence in situ hybridization, SD = standard deviation, R0 = type of tumor resection: distal and circumferential verges without tumor cells.

Editor: Jianfeng Li.

Received: July 2, 2014; revised and accepted: September 6, 2014.

From the Servicio General de Citometría, Departamento de Medicina and Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Universidad de Salamanca (MG-G, MLG, MF, AO, MS); Servicio de Cirugía General y Aparato digestivo (JC, JAA, LMG, LM-B); Servicio de Patología, (OB, MMA, AS-B, OB); Servicio de Radio-diagnóstico, Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL (MM); and Servicio de Oncología Radioterápica, Hospital Universitario de Salamanca (AR), Salamanca, Spain.

Correspondence: Prof Alberto Orfao, MD, PhD, Centro de Investigación del Cáncer, Paseo de la Universidad de Coimbra S/N, 37007 Salamanca, Spain (e-mail: orfao@usal.es).

LMB, AO and JMS contributed equally to this work and should be considered as senior last authors.

This work has been partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCI), Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain (PI12/02053-FIS), Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain (BIO/SA02/13 and GRS1040/A/14), RTICC (RD12/0020/0035-FEDER, RD12/0036/0048-FEDER), Fundación Memoria de Don Samuel Solórzano Barruso, Salamanca, Spain and Caja de Burgos (Obra Social), Burgos. JMS is supported by grant (CP05/00321) from the ISCI, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain.

The authors have no conflict of interest statement to disclose.

Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ISSN: 0025-7974

DOI: 10.1097/MD.0000000000000153

INTRODUCTION

Neoadjuvant radiochemotherapy administered prior to surgery to patients with locally advanced rectal carcinomas has proven effective in a substantial percentage of cases¹; for this purpose, 5-fluorouracile (5-FU) or capecitabine is currently recommended.^{1,2} The beneficial effects of radiochemotherapy include achievement of a lower tumor stage that allows for both less-invasive surgical procedures and preservation of the sphincters, and at the same time it is associated with less clinical complications after surgery.³ This also has been shown to lead to a reduced risk of relapse and a better patient outcome (eg, improved overall survival)^{2,4,5} as well as to an improved quality of life. Despite this, response to neoadjuvant treatment remains highly variable, ranging from complete histopathological response to absence of response, and even tumor progression in a minority of cases.⁶ At present, there is no consensus method about how to evaluate response to neoadjuvant treatment; however, the TNM staging and the Dworak regression system are well-accepted approaches, which are most commonly used to evaluate response to radiochemotherapy prior to surgery.^{6,7}

In recent years, controversial results have been reported in the literature as regards the most informative predictors for

response to neoadjuvant therapy.⁸ Thus, expression of specific molecules evaluated by immunohistochemical methods, such as p53, has shown discrepant results.^{8,9} In turn, preliminary reports have also found an association between specific genetic/chromosomal alterations and response of locally advanced rectal carcinomas to neoadjuvant therapy. Thus, Grade et al¹⁰ found a greater frequency of gains of the 7q32-q36 and 7q11-q31 chromosomal regions and amplification of chromosome 20q11-q13 as assessed by comparative genomic hybridization (CGH-arrays), among 21 responder patients out of 42 cases studied; in this report, response was determined by tumor downstage after radiochemotherapy. Based on the same methodology applied to a series of 48 patients, Molinari et al¹¹ identified a large number of chromosomal alterations that could be useful to discriminate between responder (44%) and non-responder (56%) patients, as evaluated by the Dworak criteria. However, these findings have not been prospectively validated in a larger cohort of patients using the same (eg, histopathological) treatment response criteria. In turn, none of the techniques that have been applied so far for the genetic/genomic characterization of responder versus nonresponder cases (eg, CGH-arrays) has provided information about the clonal heterogeneity of rectal cancer at the intratumoral single-cell level. This could be particularly relevant when different clones coexist at variable frequencies in a tumor sample, and only part of such clones is potentially involved in tumor sensitiveness versus resistance to radiochemotherapy administered prior to surgery.¹²

In the present study, we applied multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (*i*FISH) for the analysis of 51 different DNA sequences distributed across those chromosomes and chromosomal regions most frequently altered in locally advanced rectal carcinomas, in a series of 45 consecutive patients in which paired pretreatment and posttreatment tissue biopsies were obtained and studied. Our major goal was to establish the specific pathways of clonal evolution inside individual tumors and to investigate their potential association with response versus resistance to radiochemotherapy administered prior to surgery, as assessed by the Dworak regression system.⁷

METHODS

Patients and Samples

A total of 45 patients (15 women and 30 men; median age of 67 years, range 39–85 years) diagnosed of locally advanced rectal cancer at the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain) between September 2007 and May 2011 were included in this study. Before treatment was given, patients were grouped according to the *u*TNM classification using imaging techniques, for example, rigid rectoscopy endorectal ultrasound, colonoscopy, computed tomography, and magnetic resonance imaging. The most relevant clinical and laboratory data about the patients are summarized in Table 1 and described in more detail in Supplementary Table 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/MD/A75>. In every case, radiochemotherapy consisting of long-course radiotherapy with 50.4 Gy administered in 25 to 28 fractions, plus capecitabine (800–825 mg/m²), were given prior to surgical removal of the tumor. At this latter time point, the degree of response was scored from grade 0 (absence of tumor regression) to grade 4 (complete tumor regression), following the Dworak system (Table 1).

TABLE 1. Clinical and Biological Characteristics of Locally Advanced Rectal Cancer Patients (n=45) Before and After Treatment (radiochemotherapy) Given Prior to Surgery

Clinical Features	Pretreatment	Posttreatment	P value
Age, y	67 (39–85)	67 (39–85)	NS
Sex			NA
Female	15 (33%)	NA	
Male	30 (67%)	NA	
Tumor size, cm	NA	2.13 (0–5)	NA
Localization in the rectum			NA
Lower	4 (9%)	NA	
Medium	23 (51%)	NA	
Upper	18 (40%)	NA	
TNM			0.009
T0	0 (0%)	6 (13%)	
T1	0 (0%)	4 (9%)	
T2	1 (2%)	16 (36%)	
T3	29 (65%)	19 (42%)	
T4	15 (33%)	0 (0%)	
N0	7 (16%)	30 (67%)	0.005
N1	38 (84%)	10 (22%)	
N2	0 (0%)	5 (11%)	
M0	45 (100%)	43 (96%)	NS
M1	0 (0%)	2 (4%)	
Tumor stage			NS
Stage 0	0 (0%)	5 (11%)	
Stage I	1 (2%)	17 (38%)	
Stage II	5 (11%)	8 (18%)	
Stage III	39 (87%)	13 (29%)	
Stage IV	0 (0%)	2 (4%)	
Dworak regression grade	NA		NA
G0	NA	6 (13%)	
G1	NA	11 (25%)	
G2	NA	18 (40%)	
G3	NA	4 (9%)	
G4	NA	6 (13%)	
Type of surgery			NA
APR	NA	13 (29%)	
AR	NA	31 (69%)	
Hartmann	NA	1 (2%)	
Type of tumor resection			NA
R0	NA	41 (91%)	
R1	NA	3 (7%)	
R2	NA	1 (2%)	
CEA serum levels			0.002
≤5 ng/mL	26 (59%)	38 (88%)	
≥5 ng/mL	18 (41%)	5 (12%)	
KRAS mutation			NA
Wild-type	29 (74%)	NA	
Mutated G12D	1 (3%)	NA	
G12V	4 (10%)	NA	
G13D	5 (13%)	NA	
Local recurrence	NA	2 (4%)	NA

Results are expressed as number of cases and percentage between brackets or as median (range). TNM pretreatment status was determined by image techniques; whereas TNM posttreatment status was determined by histopathology after preoperative radiochemotherapy. Evaluation of response was performed by the Dworak regression grading system: grade 0, no regression; grade 1, dominant tumor mass with obvious fibrosis and/or vasculopathy; grade 2, dominantly fibrotic changes with few tumor cells or groups of tumor cells; grade 3, very few tumor cells in a fibrotic tissue with or without mucous substance, and; grade 4, no tumor cells, only fibrotic mass (total regression or response). APR = abdominoperineal resection, AR = anterior resection, CEA = carcinoembryonic antigen, NA = not applicable, NS = statistically not significant, R0 = distal and circumferential verges without tumor cells, R1 = distal or circumferential verges with tumor cells, R2 = distal and circumferential verges with tumor cells ($P > 0.05$).

Overall, 76 tissue samples were analyzed by *i*FISH; these included 45 pretreatment tissue biopsy samples and 31 (paired) posttreatment samples. Those 14 cases with unpaired follow-up samples corresponded to 6 cases showing complete regression of the tumor after radiochemotherapy plus 8 patients who had no left-over tissue material after the required diagnostic procedures. All samples were sequentially fixed, stained with hematoxylin and eosin and microscopically evaluated to confirm the presence of tumor cells and to assess the quality of the samples to be used for *i*FISH analyses. The study was approved by the Local Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain).

*i*FISH Assays

Premixed, methanol/acetic (3/1 vol/vol) fixed, single-cell suspensions from each individual biopsy tumor sample obtained either pre- or posttherapy ($n = 76$) were used for *i*FISH studies. A set of 51 different probes specific for those chromosomal regions most frequently altered in rectal carcinomas was systematically applied in triple stainings for the analysis of each individual sample; see Supplementary Table 2, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/MD/A75>, which illustrates the fluorochrome-labeled interphase FISH probes used for the cytogenetic characterization of locally advanced rectal carcinomas. To precisely define the specific pattern of chromosomal alterations coexisting in individual tumor cell clones within a sample, further appropriate multicolor stainings were performed, whenever necessary. The methods and procedures used for the *i*FISH studies have been previously described in detail elsewhere.¹³

Statistical Methods

For all continuous variables, mean values and their standard deviation (SD) and range were calculated; for dichotomic variables, frequencies were reported (SPSS software 15.0 package; SPSS Inc, Chicago, IL). To evaluate the statistical significance of differences observed between groups, the Student *t* and the Mann–Whitney *U* tests were used for continuous variables as well as Wilcoxon test to paired groups, depending on whether they displayed or not a normal distribution, respectively (SPSS); for qualitative variables, the χ^2 test was applied and McNemar test to paired groups (cross-tab; SPSS). Statistical significance was set at a *P* value of <0.05 .

RESULTS

Distribution of Chromosomal Alterations in Locally Advanced Rectal Cancer Before and After Radiochemotherapy

For all chromosomes analyzed, most of the rectal cancer samples obtained before treatment (44/45 tumors) showed complex karyotypes with numerical and/or structural abnormalities involving ≥ 2 chromosomal regions; the remaining case showed no chromosomal alterations for the 51 different probes investigated. Overall, gains of chromosomal regions were more frequently detected than chromosome losses (44% versus 9%, respectively; $P < .001$) (Figure 1). In most instances, chromosomal gains reflected underlying polyploid karyotypes, being polysomies of chromosomes 2 (58% of tumors), 3 (56%), 6 (47%), 7 (56%), 12 (47%), 13 (75%) and 20 (87%) the individual numerical chromosomal alterations more frequently detected (Figure 1). In turn, the most frequent structural chromosomal alterations corresponded to losses of the 1p (44% of

tumors), 8p (53%), 17p (47%), and 18q (38%) chromosomal regions and to gains of the 1q (49%) and 13q (75%) chromosomal regions, in addition to amplification of the 8q (38%) and 20q (47%) chromosomal regions. Of note, no significant associations were found between alterations of individual chromosomes and clinical disease features such as age and tumor localization ($P > 0.05$).

Posttreatment rectal cancer samples ($n = 31$) from surgical specimens obtained after a median of 5 months from diagnosis (range 3–7 months) showed a similar (eg, related) cytogenetic profile to that found in their paired pretreatment tumor samples (Figure 1). Despite this, significant differences in the number of copies detected for chromosomes 8q ($P = .004$), 13q ($P = .003$), and 20q ($P = .002$) were found between pretreatment rectal cancer samples and their paired posttreatment samples, see Supplementary Figure 1, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/MD/A75>, which illustrates the numerical alterations of chromosomes 8q24 (panel A), 13q34 (panel B), and 20q13 (panel C) in paired pre- and posttreatment tumor samples from locally advanced rectal cancer patients ($n = 31$). Notched-boxes extend from the 25th to 75th percentile values; the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively. In addition, a slightly lower ($P > 0.05$) frequency of losses of the 1p (39% vs 45%, respectively), 18p (23% vs 35%), 18q (42% vs 55%), and 19q chromosomal regions (6% vs 16%), as well as of gains of the 7p (55% vs 61%) and 17q chromosomal regions (42% vs 55%) and of chromosome Y (16% vs 28%) in males were found before versus after radiochemotherapy (Figure 1).

Chromosomal Alterations and Local Response to Preoperative Radiochemotherapy

Upon grouping rectal cancer patients according to tumor response to radiochemotherapy administered prior to surgery, a significant association was found between response to radiochemotherapy (as assessed by the Dworak grade) and rectal carcinomas displaying alterations of chromosomes 1p ($P = 0.0002$), 1q ($P = 0.03$), 11p ($P = 0.04$), 12p ($P = 0.04$), and 17p ($P = 0.03$) (Table 2); in contrast, no significant differences were found for none of the other chromosomes analyzed; see Supplementary Table 3, Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/MD/A75>, which illustrates the chromosomal alterations detected at diagnosis in locally advanced rectal cancer tumors ($n = 45$) grouped according to response to radiochemotherapy administered prior to surgery (Dworak regression grades). Therefore, del(17p) and polysomies of chromosomes 1q, 11p, and 12p were significantly more frequent among nonresponder versus responder patients; in contrast, del(1p) was found in a higher percentage of responder versus nonresponder patients (Table 2).

Intratumoral Patterns of Clonal Evolution and Response to Therapy Prior to Surgery

Detailed analysis of the pattern of chromosomal alterations of single tumor cell nuclei within individual tumors revealed the presence of ≥ 2 distinct tumor cell clones in 31 of 45 cases. Those clones, which contained chromosomal alterations common to all tumor cells in an individual tumor, were considered to be ancestral tumor cell clones, whereas those presenting alterations, which involved only a fraction ($>10\%$ – 90%) of all tumor cells, were considered to be secondary clones.^{13,14} Ancestral tumor cell clones were highly variable, but they

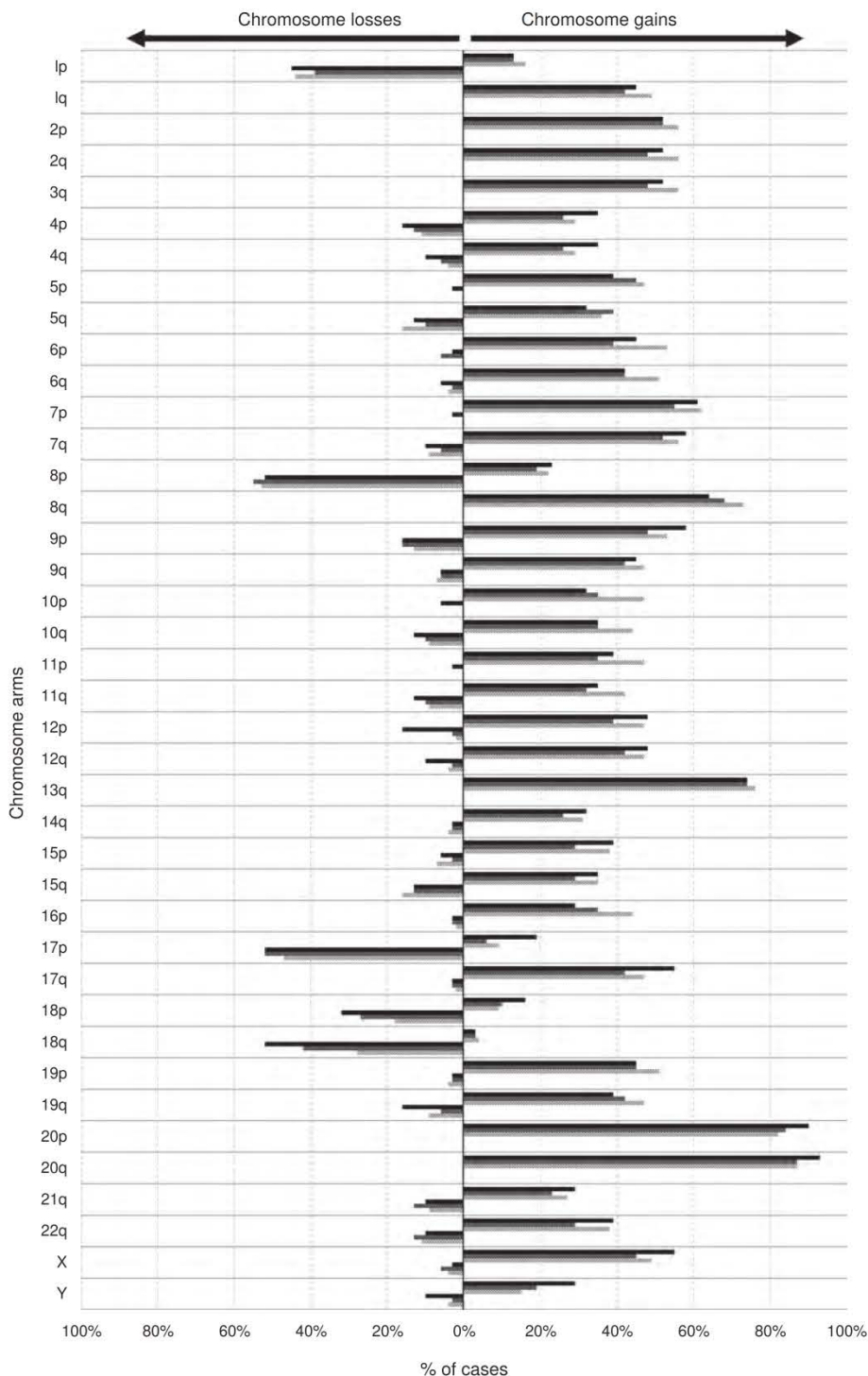


FIGURE 1. Frequency of chromosome gains and losses identified by interphase fluorescence in situ hybridization in locally advanced rectal carcinoma samples obtained prior to therapy (dotted bars; n = 45 and grey bars; n = 31 paired samples to those studied after therapy) and after radiochemotherapy (dark bars; n = 31). Those chromosomal regions most frequently showing recurrent losses and gains were localized in chromosomes 1p, 8p, 17p, and 18q, and the 8q, 13q, and 20q chromosomal regions, respectively.

TABLE 2. Chromosomal Alterations Detected at Diagnosis in Locally Advanced Rectal Cancer Tumors (n=45), Which Were Associated With the Grade of Tumor Regression (Dworak Grade) After Radiochemotherapy was Administrated Prior to Surgery

	Nonresponders (G0 and G1) (n = 17)	Partial Responders (G2) (n = 18)	Responders (G3 and G4) (n = 10)	P	Total Cases (n = 45)
1p					
del(p)	6 (30%)	5 (25%)	9 (45%)	0.0002	20 (100%)
Normal	11 (61%)	6 (33%)	1 (6%)		18 (100%)
Polysomy	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)		7 (100%)
1q					
Normal	13 (57%)	7 (30%)	3 (13%)	0.03	23 (100%)
Polysomy	4 (18%)	11 (50%)	7 (32%)		22 (100%)
11p					
Normal	13 (54%)	8 (33%)	3 (13%)	0.04	24 (100%)
Polysomy	4 (19%)	10 (48%)	7 (33%)		21 (100%)
12p					
del(p)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0.04	1 (100%)
Normal	13 (56%)	7 (30%)	3 (14%)		23 (100%)
Polysomy	4 (19%)	11 (52%)	6 (29%)		21 (100%)
17p					
del(p)	8 (36%)	12 (55%)	2 (9%)	0.03	22 (100%)
Normal	9 (48%)	5 (26%)	5 (26%)		19 (100%)
Polysomy	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)		4 (100%)

Results expressed as number of cases and percentage between brackets.

commonly showed recurrent loss of chromosome 8p (51% of cases) and gains of the 8q, 13q, and 20q chromosomal regions (60% of cases).

Most interestingly, a clear association was found ($P < .05$) between those cytogenetic profiles of the ancestral tumor clone detected prior to surgery that involved alterations of chromosomes 1p, 1q, 11p, 12p, and 17p and response to radiochemotherapy (Figure 2). Thus, ancestral tumor clones carrying del(17p) alone (2/17 cases; 12%) or in combination with either del(1p) alone (2/17 cases; 12%) or in association with gains of chromosomes 11 and 12 (4/17 cases; 23%, were typically found

among non-responder (G0/G1) cases, 8/17 cases (47%) vs. 2/10 (20%) responder cases (G3/G4). Similarly, del(17p) alone (3/18; 17%) or in association with either gains of chromosomes 1, 11, and 12 (7/18; 39%) or structural alterations of chromosome 1, for example, del(1p), and gain of chromosome 1q (2/18; 11%) was also present in the majority of the partial responder (G2) cases (12/18 cases; 75%), whereas absent in most (8/10 [80%]) responder cases ($P = .04$). Partial responders also recurrently showed del(1p) (3/18 cases; 17%) in their ancestral clone in association with gains of chromosomes 11 and 12 alone (1/18 cases) or in combination with +1q (2/18

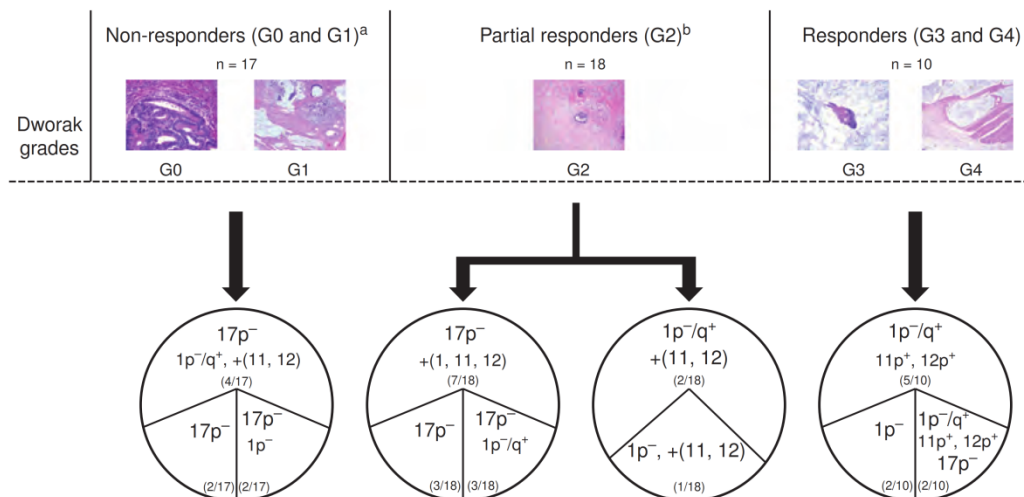


FIGURE 2. Intratumoral cytogenetic heterogeneity of locally advanced rectal cancer prior to radiochemotherapy as evaluated by the cytogenetic profile of the ancestral tumor cell clones grouped according to response to therapy (Dworak grade). (A) 9/17 non-responder cases (G0 and G1) showed other heterogeneous cytogenetic profiles in their ancestral tumor clones, which are not represented here; (B) 5/18 partial responder (G2) cases also showed other cytogenetic profiles in their ancestral tumor clones, which are not represented here.

cases). Interestingly, similar profiles characterized by del(1p) were present in the ancestral tumor cell clone of all but one responder (G3 and G4) cases (9/10; 90%) as the earliest chromosomal alteration (Figure 3); in such cases, del(1p) was detected as the only chromosomal alteration (2/10; 20%) or it was associated with gains of chromosomes 1q, 11p and 12p (5/10; 50%) or del(17p) in 2/10 cases (20%).

Of note, secondary chromosomal alterations observed in responder cases (eg, 8q, 13q, and 20q amplifications) were similar to those identified also in secondary clones from patients with a poorer response, but they were detected in higher ($P = .002$) percentages of tumor cells in posttreatment samples; see Supplementary Figure 2, Supplemental Digital Content 5, <http://links.lww.com/MD/A75>, which illustrates the genetic heterogeneity of locally advanced rectal carcinomas: hypothetical intratumoral aneuploidization pathways deduced for those chromosomal alterations (1p, 1q, 11p, 12p, and 17p) which showed a significant association with response to therapy as assessed by the Dworak grading system. Overall, the cytogenetic patterns associated with clonal evolution of the ancestral tumor cell clones detected in the tumor samples studied prior to radiochemotherapy versus those observed in posttreatment samples were variable, but they frequently involved gradual copy number gains of chromosomes 8q, 13q, and 20q; see Supplementary Figure 2, Supplemental Digital Content 5, <http://links.lww.com/MD/A75>, which illustrates the genetic heterogeneity of locally advanced rectal carcinomas: hypothetical intratumoral aneuploidization pathways deduced for those chromosomal alterations (1p, 1q, 11p, 12p and 17p), which showed a significant association with response to therapy as assessed by the Dworak grading system.

DISCUSSION

In recent years, administration of neoadjuvant radiochemotherapy prior to surgery, to locally advanced rectal cancer patients has become standard clinical practice.¹ Despite such treatment strategy has been associated with an overall benefit

for the patient,^{2,3,15} still the degree of response to radiochemotherapy remains highly variable among different patients.¹⁶ Thus, although 5% to 25% of patients achieve complete remission (complete absence of tumor cells) and 40% to 60% reach a significant reduction in tumor mass, around 20% to 30% of cases do not respond to therapy and some of them may even show disease progression.¹⁶ At present, it still remains poorly understood which tumors are more prone to be sensitive versus resistant to radiochemotherapy administered prior to surgery and which are those factors that determine a good versus poor response to preoperative radiochemotherapy. Among other variables, the cytogenetic background of tumor cells has been suggested to potentially play a role, due to the relatively high cytogenetic heterogeneity of tumor cells among different tumors, as well as within individual tumors.^{13,17,18} Here we used multicolor *i*FISH for detailed analysis of the cytogenetic heterogeneity of locally advanced rectal cancer tumors, both at the inter- and the intratumoral cell levels, evaluated before and after preoperative radiochemotherapy; our major goal was to gain insight into the most frequent pathways of intratumoral clonal evolution that could be associated with response versus resistance to neoadjuvant therapy.

Previous studies have consistently identified a high frequency of complex karyotypes with gains of chromosomes 7, 8q, 13q, and 20 and losses of the 1p, 5q, 8p, 14q, 15q, 17p, and 18q chromosomal regions,^{10,11,13,19-21} among locally advanced rectal cancer tumor patients. In line with these observations, all, except 1, rectal cancer tumor samples obtained prior to therapy showed complex karyotypes with ≥ 2 altered chromosomes. As previously described, the most frequent alterations here observed included gains of chromosomes 7, 8q, 13q, and 20q and losses of the 1p, 8p, 17p, and 18q chromosomal regions. Of note, alterations of the 8q, 13q, and 20q chromosomal regions were observed at similar frequencies in all groups of patients defined according to response to therapy (eg, Dworak grades). Interestingly, however, important differences among cases showing a different grade of response to neoadjuvant therapy were identified as regards the patterns of intratumoral clonal

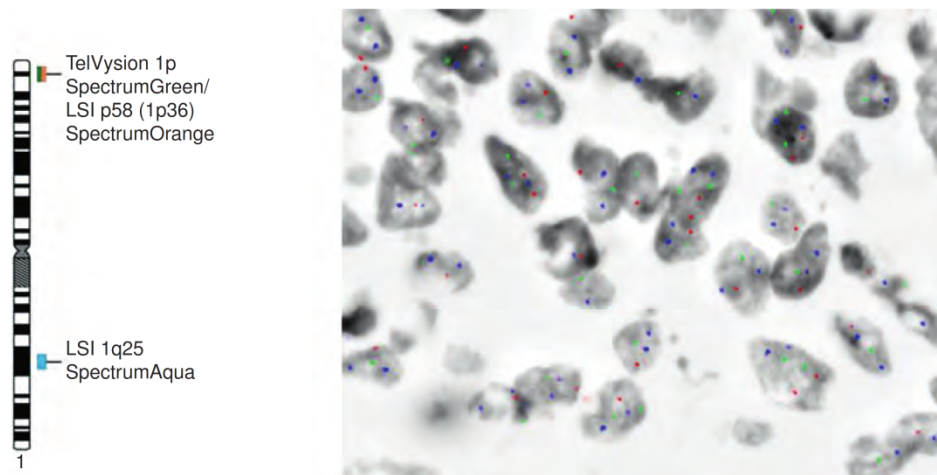


FIGURE 3. Interphase nuclei from a biopsy sample of a patient with locally advanced rectal cancer who achieved complete tumor regression after neoadjuvant therapy. Cell nuclei shows loss of the 1p chromosomal region, as defined by simultaneous hybridization for the Tel1p (green spots), 1p36 (red spots), and 1q25 (blue spots) chromosome 1 regions; altered nuclei only show one copy for the Tel1p and 1p36 probes and 2 copies for the chromosome 1q25 probe.

evolution, particularly the cytogenetic profiles of the ancestral tumor cell clones for chromosomes 1, 11p, 12p, and 17p. Thus, del(17p) predominated among the ancestral clone of nonresponder patients (Dworak grades 0 and 1), whereas alterations of chromosome 1 in the absence of del(17p) were more frequently observed in the ancestral tumor cell clone of responder (Dworak grades 3 and 4) cases. Partial responders (Dworak grade 2) included a heterogeneous group of patients from both the histopathological and the genetic point of view with cases carrying either alterations of chromosome 1 (as the responder G3 and G4 cases) and/or displaying del(17p) in their ancestral tumor cell clones (similarly to the nonresponder G0 and G1 cases). Altogether, these results suggest that response to radiochemotherapy administered prior to surgery is associated with specific cytogenetic profiles reflected by potential “driver” chromosomal alterations, further studies being necessary to investigate the precise molecular mechanisms involved in tumor cell sensitivity and resistance to therapy.

Despite all the above, combined loss of chromosomes 1p and 19q is well documented to be associated with sensitiveness to radiochemotherapy in oligodendroglial tumors,^{22,23} the *PRDX1* antioxidant protective gene encoded at chromosome 1p34 being potentially involved in radiochemosensitivity in these tumors.²² In addition, gains of chromosome 1q²⁴ have also been reported to be associated with sensitivity to chemotherapy in glioma patients²⁴ and similarly, gain of the *ABL2* gene encoded at chromosome 1q25 in non-small cell lung cancer has been related to a good in vitro response to chemotherapy as well.²⁵ In contrast, del(17p) has long been reported in metastatic colorectal carcinomas where it has been associated with a poorer outcome.^{20,21,26} Furthermore, del(17p) is frequently associated with *TP53* mutations localized at the deleted region in the retained 17p13 chromosomal band, and *TP53* mutations have long been associated with a poor response to radiochemotherapy of both colorectal cancer^{27,28} and other cancer types, (eg, head and neck carcinomas treated with 5-FU).²⁹ In addition, del(17p) alone or in combination with *TP53* mutations has also proven to be associated with resistance to chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia.^{30,31} In line with these findings in a meta-analysis, Chen et al³² have recently shown that the *TP53* status could be used as a predictive biomarker for rectal cancer patients treated with radiochemotherapy prior to surgery. For decades now, it is well established that mutated *TP53* frequently prevents tumor cells from undergoing apoptosis, even in the presence of marked DNA damage^{33,34}; consequently, this may contribute to explain not only the lower response here observed to radiochemotherapy among cases which carry del(17p) in their ancestral tumor clone, but also the occurrence of both cytogenetic and clinical progression after therapy in a subset of these cases. In line with these findings, Petty et al³⁵ have also identified the expression of the *APRIL* gene, a paracrine/autocrine molecule involved in signaling for cell proliferation, which is encoded in the vicinity of gene *TP53*, to be significantly associated with resistance to 5-FU in colorectal cancer patients. Altogether, these findings are in line with our observations pointing out the overall association between presence of del(17p) and a poorer response to radiochemotherapy.

Regarding chromosome 12p, Chen et al³⁶ have reported an association between del(12p) and complete response to neoadjuvant treatment of rectal cancer patients. However, it should be noted that in our series, gains of chromosome 12p were more frequently detected than del(12p), the only case that displayed del(12p) corresponding to a responder patient (G3). Despite

this, the precise mechanisms involved in the association here described between the gains of chromosomes 12p and 11p, in association with del(1p), and response to therapy remain to be elucidated.

Interestingly, similar cytogenetic profiles were found in our series between paired pre- and posttreatment tumor samples, although the frequency of individual chromosomal alterations was typically slightly increased after therapy. Moreover, in most cases, the predominant tumor cell clone detected before therapy was also highly represented in posttreatment samples; however, in a subset of our patients (n = 7), minor clones detected prior to radiochemotherapy became dominant in posttreatment samples. Overall, the cytogenetic relationship here observed between pre- and posttreatment samples supports previous observations made by others in different cancer types such as ovarian cancer,³⁷ central nervous system tumors,³⁸ hematological malignancies,^{39,40} or cervical cancer.⁴¹ Acquisition of new (additional) genetic alterations and clonal selection has also been recurrently described for different cancer types.^{17,18,42} However, we cannot fully rule out that in these latter cases, variations in clone size are due to a different distribution of distinct tumor cell clones in different areas of the tumor.^{17,18,42,43} Of note, among other chromosomal alterations, posttreatment samples frequently carried additional gains of the 8q, 13q, and 20q chromosomal regions, independently of the degree of response to adjuvant radiochemotherapy. Interestingly, all 3 chromosomal alterations have been recurrently associated with tumor progression and more aggressive phenotypes.^{19,20,44} The exact meaning of the acquisition of multiple/additional copies of these chromosomal regions remains to be elucidated.

In summary, in the present study, we observed significant association between the cytogenetic profile of the ancestral tumor cell clones of locally advanced rectal cancer patients and response to radiochemotherapy administered prior to surgery: del(17p) was associated with poor-responders, whereas del(1p) was more closely associated with a better response. Further studies are required to confirm our results and to determine the precise molecular mechanisms involved in such association and discover potential ways to reverse them.

REFERENCES

1. Benson AB III, Bekaii-Saab T, Chan E, et al. Rectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012;10:1528–1564.
2. Theodoropoulos G, Wise WE, Padmanabhan A, et al. T-level downstaging and complete pathologic response after preoperative chemoradiation for advanced rectal cancer result in decreased recurrence and improved disease-free survival. *Dis Colon Rectum*. 2002;45:895–903.
3. Rodel C, Martus P, Papadopoulos T, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:8688–8696.
4. de Campos-Lobato LF, Stocchi L, da Luz Moreira A, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant treatment for rectal cancer decreases distant recurrence and could eradicate local recurrence. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:1590–1598.
5. Yeo SG, Kim DY, Kim TH, et al. Pathologic complete response of primary tumor following preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: long-term outcomes and prognostic significance of pathologic nodal status (KROG 09-01). *Ann Surg*. 2010;252:998–1004.
6. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European

- Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:205–216.
7. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis.* 1997;12:19–23.
 8. Saw RP, Morgan M, Koorey D, et al. p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum.* 2003;46:192–202.
 9. Edden Y, Wexner SD, Berho M. The use of molecular markers as a method to predict the response to neoadjuvant therapy for advanced stage rectal adenocarcinoma. *Colorectal Dis.* 2012;14:555–561.
 10. Grade M, Gaedcke J, Wangsa D, et al. Chromosomal copy number changes of locally advanced rectal cancers treated with preoperative chemoradiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009;193:19–28.
 11. Molinari C, Ballardini M, Teodorani N, et al. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol.* 2011;6:161.
 12. Shakuov TS. The comparison of three methods for chromosomal abnormality detection. *J Bioinform Comput Biol.* 2006;4:1217–1226.
 13. Sayagues JM, Abad Mdel M, Melchor HB, et al. Intratumoral cytogenetic heterogeneity of sporadic colorectal carcinomas suggests several pathways to liver metastasis. *J Pathol.* 2010;221:308–319.
 14. Sayagues JM, Tabernero MD, Maillo 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 Diagn.* 2004;6:316–325.
 15. Janjan NA, Abbruzzese J, Pazdur R, et al. Prognostic implications of response to preoperative infusional chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Radiother Oncol.* 1999;51:153–160.
 16. Park IJ, You YN, Agarwal A, et al. Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30:1770–1776.
 17. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012;481:306–313.
 18. Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol.* 2012;13:e178–e185.
 19. Sayagues JM, Fontanillo C, Abad Mdel M, et al. Mapping of genetic abnormalities of primary tumours from metastatic CRC by high-resolution SNP arrays. *PLoS One.* 2010;5:e13752.
 20. Munoz-Bellvis L, Fontanillo C, Gonzalez-Gonzalez 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;25:590–601.
 21. Gonzalez-Gonzalez M, Munoz-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:e42683.
 22. Dittmann LM, Danner A, Gronych J, et al. Downregulation of PRDX1 by promoter hypermethylation is frequent in 1p/19q-deleted oligodendroglial tumours and increases radio- and chemosensitivity of Hs683 glioma cells in vitro. *Oncogene.* 2012;31:3409–3418.
 23. Thiessen B, Maguire JA, McNeil K, et al. Loss of heterozygosity for loci on chromosome arms 1p and 10q in oligodendroglial tumors: relationship to outcome and chemosensitivity. *J Neurooncol.* 2003;64:271–278.
 24. Takahashi S, Hirose Y, Ikeda E, et al. Chromosome arm 1q gain associated with good response to chemotherapy in a malignant glioma. Case report. *J Neurosurg.* 2007;106:488–494.
 25. Sos ML, Michel K, Zander T, et al. Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest.* 2009;119:1727–1740.
 26. Diep CB, Thorstensen L, Meling GI, et al. Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2003;21:820–829.
 27. Hiro J, Inoue Y, Toiyama Y, et al. Mechanism of resistance to chemoradiation in p53 mutant human colon cancer. *Int J Oncol.* 2008;32:1305–1310.
 28. Subbarayan PR, Sarkar M, Nelson G, et al. Chronic exposure of colorectal cancer cells in culture to fluoropyrimidine analogs induces thymidylate synthase and suppresses p53. A molecular explanation for the mechanism of 5-FU resistance. *Anticancer Res.* 2010;30:1149–1156.
 29. Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, et al. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol.* 2000;18:1465–1473.
 30. Zenz T, Habe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood.* 2009;114:2589–2597.
 31. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2013;88:803–816.
 32. Chen MB, Wu XY, Yu R, et al. P53 status as a predictive biomarker for patients receiving neoadjuvant radiation-based treatment: a meta-analysis in rectal cancer. *PLoS One.* 2012;7:e45388.
 33. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, et al. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:170325.
 34. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene.* 2001;277:15–30.
 35. Petty RD, Samuel LM, Murray GI, et al. APRIL is a novel clinical chemo-resistance biomarker in colorectal adenocarcinoma identified by gene expression profiling. *BMC Cancer.* 2009;9:434.
 36. Chen Z, Liu Z, Li W, et al. Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011;50:689–699.
 37. Cooke SL, Ng CK, Melnyk N, et al. Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncogene.* 2010;29:4905–4913.
 38. Espinosa AB, Tabernero MD, Maillo A, et al. The cytogenetic relationship between primary and recurrent meningiomas points to the need for new treatment strategies in cases at high risk of relapse. *Clin Cancer Res.* 2006;12 (3 Pt 1):772–780.
 39. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood.* 2012;120:1067–1076.
 40. Schmidt-Hieber M, Gutierrez ML, Perez-Andres M, et al. Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells. *Haematologica.* 2013;98:279–287.
 41. Cooke SL, Temple J, Macarthur S, et al. Intra-tumour genetic heterogeneity and poor chemoradiotherapy response in cervical cancer. *Br J Cancer.* 2011;104:361–368.
 42. Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res.* 2012;72:4875–4882.

43. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366:883–892.
44. Hu XT, Chen W, Wang D, et al. The proteasome subunit PSMA7 located on the 20q13 amplicon is overexpressed and associated with liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2008;19:441–446.

DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal esporádico (sCRC) es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo occidental¹, debido en gran medida a la ausencia de síntomas durante las primeras fases de desarrollo y progresión del tumor; esto retrasa el diagnóstico que termina haciéndose en fases relativamente avanzadas de la enfermedad. De hecho, entre 15% y 25% de los pacientes con sCRC muestran enfermedad metastásica ya en el momento del diagnóstico¹, siendo el hígado el tejido más frecuentemente afectado, lo cual confiere a este grupo de pacientes un pronóstico especialmente adverso^{3, 32}.

En las últimas décadas se ha avanzado de forma notable en el conocimiento de las alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo y progresión del sCRC⁹³. Sin embargo, siguen sin identificarse de forma específica aquellas alteraciones genéticas responsables de la aparición de células tumorales capaces de invadir otros tejidos a distancia^{215, 216}. En la actualidad, se considera que el proceso metastásico es un proceso complejo y consecuencia de la acumulación secuencial de múltiples alteraciones genéticas, moleculares y/o cambios epigenéticos que involucran a uno o múltiples clones de células presentes en el tumor primario^{212, 214, 216, 218}. Así, en los últimos años, los resultados de varios estudios basados en la caracterización de las alteraciones cromosómicas y moleculares presentes en tumores primarios de colon y sus correspondientes metástasis hepáticas, han sugerido que las lesiones metastásicas hepáticas podrían derivar del establecimiento en el hígado de uno o más clones de células tumorales presentes ya en el tumor primario y que muestran características genéticas únicas y bien definidas^{213, 215, 217, 219, 224}. A pesar de la identificación de estos perfiles de alteración genética asociados a la diseminación del tumor, aún no se han podido establecer con precisión, cuáles determinan en concreto el valor pronóstico adverso de estos pacientes y/o pueden ser susceptibles de constituir dianas terapéuticas.

Por todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo doctoral nos planteamos como objetivos iniciales, determinar que alteraciones cromosómicas y perfiles de alteraciones genéticas están presentes en los pacientes con sCRC metastásico y que condicionan un peor pronóstico, definido por una SG significativamente más corta.

Dentro de los pacientes con sCRC, aquellos pacientes diagnosticados de cáncer rectal localmente avanzado, constituyen un grupo específico único, con un abordaje terapéutico distinto en la actualidad, y que consiste en la administración de RQT neoadyuvante de forma previa a la cirugía^{49, 303}. Esto es debido a

que este tipo de tratamiento ha demostrado una eficacia notable en un porcentaje sustancial de casos, con disminución del estadio tumoral, facilitando la realización de procedimientos quirúrgicos menos invasivos, con preservación de esfínteres y mayor calidad de vida de los pacientes, asociado además a menor riesgo de recaída^{34, 68, 69}. Sin embargo, la respuesta al tratamiento neoadyuvante sigue siendo muy variable, observándose desde respuestas completas a ausencia completa de respuesta, e incluso, en una minoría de casos, progresión tumoral durante el tratamiento^{49, 67, 70}. Por todo ello, este subgrupo de sCRC merece una consideración especial.

En los últimos años, diferentes autores han referido resultados controvertidos en cuanto a los marcadores genéticos con valor predictivo para la respuesta a RQT pre-operatoria en el cáncer de recto^{304, 305}. Además, las técnicas utilizadas en estos trabajos para la detección de alteraciones genéticas, únicamente han proporcionado información sobre las alteraciones que globalmente estaban presentes en cada tumor, sin abordar la heterogeneidad clonal del cáncer de recto a nivel intra-tumoral²⁹⁸. La existencia de diferentes clones de células tumorales dentro de un mismo tumor, podría ser particularmente relevante en lo que a la respuesta a la RQT se refiere, ya que los clones de células tumorales que muestran diferentes perfiles genéticos y que coexisten en el tumor en distinta frecuencia, podrían mostrar también diferente grado de sensibilidad o resistencia al tratamiento administrado de forma previa a la cirugía. Así, nuestro siguiente objetivo se centró en definir qué alteraciones genéticas y vías de evolución clonal presentes a nivel intra-tumoral se asocian con la respuesta al tratamiento neoadyuvante administrado a pacientes con cáncer rectal localmente avanzado.

En este apartado de la memoria del trabajo doctoral, abordaremos de forma secuencial la discusión de los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos planteados.

Valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas asociadas al sCRC metastásico.

La presencia de metástasis tumorales al diagnóstico en pacientes con sCRC, constituye uno de los parámetros clínicos más relevantes a la hora de establecer el protocolo terapéutico más adecuado y predecir la evolución de la enfermedad en términos de supervivencia global^{31, 46, 57}. A pesar de los avances en el conocimiento que en la actualidad tenemos acerca de las alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo y progresión del sCRC^{94, 104, 111, 114, 124}, hoy por hoy sigue siendo muy limitada la información de la que disponemos acerca de las alteraciones genéticas involucradas en el proceso metastásico, y dentro de ellas, de las que realmente determinan el pronóstico adverso de estos pacientes. Ante estos antecedentes, el primer objetivo de este trabajo doctoral se centró en determinar el valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas, de tipo numérico y estructural más frecuentemente detectadas en tumores primarios de pacientes con sCRC metastásico, aplicando para ello técnica de *i*FISH a dos grupos de pacientes: sCRC con metástasis hepáticas sincrónicas y pacientes con sCRC no metastásico demostrado tras un largo periodo de seguimiento (mediana de 8 años).

De acuerdo con observaciones previas referidas en la bibliografía, nuestros resultados muestran que los dos grupos de pacientes analizados (sCRC metastásico vs. sCRC no metastásico) compartían múltiples alteraciones cromosómicas, entre las que se incluían la ganancia del cromosoma 7 y de las regiones cromosómicas 8q, 13q y 20q, así como las pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 8p, 14q y 18q³⁰⁶⁻³⁰⁹. Por el contrario, otras alteraciones cromosómicas estaban presentes de forma casi restringida a pacientes con tumores metastásicos. Entre estas últimas alteraciones se incluían pérdidas a nivel del cromosoma 17p, (especialmente deleciones que afectaban a la región 17p11.2), y la del(22q). Estos hallazgos sugieren que ambas alteraciones –del(17p) y del(22q)- podrían tener un papel relevante en el proceso de metastatización de los tumores primarios de colon.

De acuerdo con estos hallazgos, estudios previos en los que se ha empleado una metodología diferente a la utilizada en nuestro trabajo, han demostrado que más de la mitad de los sCRC primarios presentan del(17p13) y que la frecuencia de esta alteración se ve incrementada entre los tumores

metastásicos^{105, 310-313}. En este sentido nuestro grupo, empleando arrays de SNPs de alta densidad para el análisis de las alteraciones genéticas presentes en tumores primarios de pacientes con sCRC y sus correspondientes metástasis hepáticas, ha demostrado también hace unos años, que las pérdidas observadas a nivel del cromosoma 17p no se restringen solo a la región cromosómica 17p13 que involucra al gen *TP53*, sino que por el contrario, abarcan regiones de mayor tamaño^{217, 219}, asociándose la del(17p13) con punto de ruptura a nivel de del(17p11.2) de forma casi exclusiva a sCRC con metástasis hepáticas (67% vs. 10%). En conjunto, todos estos hallazgos ponen de manifiesto la posibilidad de que en esta región cromosómica estén codificados genes involucrados en el proceso metastásico.

La otra alteración cromosómica que en nuestro trabajo se asoció con sCRC metastásico fue la del(22q), detectada exclusivamente en una fracción de estos pacientes, aunque en frecuencia menor a la observada para la del(17p). Las pérdidas a nivel del cromosoma 22q se han relacionado anteriormente en la bibliografía con estadios avanzados del sCRC, incluyendo por lo tanto también, los tumores metastásicos³¹⁴⁻³¹⁸. En este sentido, estudios recientes han referido que la presencia de LOH en las regiones cromosómicas 17p, 18q y 22q estaría estrechamente relacionada entre si y asociada a un mayor potencial metastásico del sCRC^{312, 314, 317}. Por otra parte, a título individual, la presencia de LOH a nivel del cromosoma 17p se ha relacionado con mayor capacidad de invasión vascular del tumor, mientras que la presencia de LOH a nivel del cromosoma 22q se ha correlacionado con mayor grado de invasión linfática y presencia de metástasis ganglionares^{314, 317}. En conjunto estos hallazgos estarían de acuerdo con nuestros resultados acerca de la existencia de una estrecha relación entre la presencia de del(17p) y/o del(22q) y un mayor potencial metastásico del sCRC.

Un hallazgo adicional, a nuestro entender relevante, de los análisis realizados en este trabajo doctoral, es la observación de que cuando estaban presentes, tanto la del(17p) -incluida la del(17p11.2)- como la del(22q), afectaban a todas las células tumorales analizadas, sugiriendo que ambas alteraciones constituyen parte integrante del genoma de los clones ancestrales del tumores primarios con potencial metastásico. Si esto fuese cierto, la identificación de estas alteraciones genéticas en tumores primarios de sCRC, podría constituir un parámetro de gran utilidad para predecir un mayor grado de agresividad del

tumor y una mayor capacidad invasiva del mismo ya al diagnóstico, e independientemente del estadio en el que se encuentre el tumor en ese momento³¹⁹.

En la bibliografía se han referido los resultados de diferentes estudios en los que se ha intentado relacionar la presencia de alteraciones genéticas concretas detectadas mediante técnicas de arrays, con el pronóstico de los pacientes con sCRC^{309, 310, 320}. En nuestro trabajo, la evaluación del impacto pronóstico sobre la SG, de las alteraciones cromosómicas presentes en los sCRC analizados, mostró la existencia de valor pronóstico independiente tanto para la del(17p) como la del(22q), asociándose la existencia de ambas anomalías cromosómicas con una SG significativamente más reducida. En la bibliografía, además de estas dos alteraciones cromosómicas, se han asociado también a un pronóstico adverso las pérdidas de la región cromosómica 18q12.2 identificadas mediante arrays de oligonucleótidos³²⁰; no obstante, esta alteración no mostró impacto pronóstico entre nuestros pacientes. Con el fin de validar el valor pronóstico de la del(17p) y la del(22q) encontradas en nuestra serie, re-analizamos los datos genómicos resultantes de un estudio independiente³²⁰ y que se encontraban disponibles en la base de datos GEO (GSE12520)³²⁰. Este re-análisis, permitió confirmar el valor pronóstico de la del(17p), incluyendo el impacto pronóstico adverso de la del(17p) con punto de ruptura a nivel de 17p11.2; por el contrario, no pudimos confirmar el valor predictivo sobre la SG de la del(22q) sobre esta misma serie independiente de pacientes con sCRC.

Dada la posible relevancia clínica de las deleciones a nivel de 17p y 22q antes referidas, nuestro interés se centró a continuación en identificar los genes codificados en ambas regiones que pudieran contribuir a conferir dicho valor pronóstico adverso. Así, identificamos en conjunto 36 genes que están codificados en ambas regiones cromosómicas delecionadas. Treinta de esos 36 genes están codificados en las regiones cromosómicas 17p11.2 y 17p13, habiéndose implicado previamente 10 de ellos en procesos neoplásicos; los 6 genes restantes están codificados en la región cromosómica 22q delecionada, habiéndose relacionado únicamente uno de ellos con cáncer. De los 11 genes involucrados en procesos neoplásicos, la pérdida de expresión del gen *MAP2K3* (17p11.2) se ha asociado previamente en adenocarcinoma de mama con tumores infiltrantes³²¹, así como con un mayor grado de invasión tumoral y una menor SG en diversos otros tipos de cáncer^{321, 322}. De forma similar, las alteraciones en los niveles de

expresión del gen *KCNJ12* se cree podrían constituir un elemento clave en el desarrollo de rhabdomiomas en modelos murinos³²³. Por otra parte, aunque en la actualidad seguimos sin conocer el papel que juega el gen *FAM27L* en la patogenia del cáncer, la pérdida de este gen y algunos polimorfismos del mismo, se han asociado previamente a tumores sCRC²¹⁹, y un mayor riesgo de desarrollar leucemia linfática crónica, respectivamente³²⁴. Respecto al gen *USP22*, implicado en la activación del ciclo celular a través de la vía de señalización PIK3/AKT^{325, 326}, y en la transición epitelio-mesénquimal clave en el proceso metastásico³²⁷, se ha descrito una expresión alterada del mismo en sCRC, que a su vez estaría relacionada con la presencia de metástasis hepáticas y un pronóstico adverso. Finalmente, la pérdida de mayor tamaño a nivel del cromosoma 17p, podrían afectar además a otros genes supresores de tumor diferentes de *TP53*, presentes en esta región del genoma^{64, 102}. De acuerdo con ello, el análisis de las interacciones existentes entre estos genes y otros genes a los que regulan, mostró la existencia de una asociación con varios biomarcadores tumorales bien establecidos en el sCRC como *EGFR*, *BCL2* y *BAX*, confirmando su implicación en vías de señalización relacionadas con el crecimiento, proliferación y muerte celular.

En conjunto, los resultados derivados del primer objetivo de nuestro trabajo sugieren que la presencia de del(17p), especialmente cuando se encuentra afectada la región 17p11.2, podría constituir un factor pronóstico adverso independiente en el sCRC; es más, la coexistencia de esta alteración junto con la del(22q) permitiría identificar ya en el momento del diagnóstico, un grupo de pacientes con sCRC con una SG especialmente acortada, lo que podría deberse a que la pérdida combinada de los genes codificados en ambas regiones cromosómicas, conlleve un aumento de la proliferación y supervivencia celular y una disminución en los procesos de reparación del ADN, dado el papel regulador que desarrollan los genes codificados en estas regiones cromosómicas en dichas funciones celulares.

Perfiles genéticos del sCRC metastásico con impacto pronóstico.

De acuerdo con los hallazgos anteriores, la presencia de del(17p), especialmente cuando se encuentra afectada la región cromosómica 17p11.2, y de del(22q), se asocian de forma significativa en pacientes con sCRC con la existencia de metástasis y con una SG significativamente más corta. No obstante,

la técnica de *i*FISH empleada presenta importantes limitaciones relacionadas con su escasa resolución, a la hora de poder identificar de forma específica que genes de los codificados en ambas regiones cromosómicas están realmente afectados^{294, 298}. En los últimos años, los avances tecnológicos ocurridos en el campo de la genómica incluido el desarrollo de arrays de SNPs de alta densidad, han permitido el mapeo del genoma completo, y con su elevada resolución (2.5kb), la identificación de pérdidas y ganancias de regiones cromosómicas de pequeño tamaño^{296, 297}. Por todo ello, el segundo objetivo de nuestro trabajo doctoral se centró en definir con mayor detalle el perfil genético de pérdidas y ganancias cromosómicas a lo largo de todo el genoma característico de los sCRC metastásicos. De este modo, pretendíamos identificar de forma más pormenorizada aquellas alteraciones genéticas que están presentes en los tumores primarios de los pacientes con sCRC metastásico que se asocian tanto con este grupo de tumores sCRC como con un pronóstico más adverso de la enfermedad; además, con el empleo de arrays de SNPs pretendíamos también profundizar también en el conocimiento de los genes codificados en las regiones alteradas. Para ello, analizamos las alteraciones genéticas presentes en las células tumorales de tumores primarios de pacientes con sCRC que presentaban metástasis hepáticas sincrónicas, comparando los perfiles genéticos encontrados con los detectados en pacientes con sCRC que tras un periodo largo de seguimiento (mediana de >8 años) no habían desarrollado metástasis.

Al igual que observado lo previamente con técnicas de *i*FISH, el empleo de arrays de SNPs confirmó la existencia de un amplio repertorio de alteraciones cromosómicas comunes a pacientes con sCRC metastásicos y sujetos con tumores no metastásicos; entre ellas se incluían pérdidas de las regiones cromosómicas 3p, 5q, 8p, 10q, 14q, 15q y 22q, además de la monosomía 4, y ganancias de las regiones cromosómicas 1q, 2p, 3q, 5p, 6q, 8q, 11p y 20q^{217, 219, 319}. En paralelo, identificamos también alteraciones cromosómicas que estaban presentes en mayor frecuencia entre tumores primarios de pacientes con sCRC que presentaban metástasis hepáticas sincrónicas respecto a los que padecían tumores primarios no metastásicos. Estas alteraciones incluían 58 regiones cromosómicas de las que merece destacar: i) la pérdida de secuencias de ADN localizadas en las regiones cromosómicas 1p, 17p y 18q, así como ii) la ganancia de los cromosomas 7 y 13q, alteraciones que habían sido ya descritas previamente en el sCRC por

otros autores, empleando técnicas citogenéticas de menor resolución^{136, 306, 319, 328-330}. Desde el punto de vista pronóstico, la alteración de la gran mayoría (casi tres cuartas partes) de estas regiones cromosómicas asociadas a sCRC metastásico, se asociaba además también con un pronóstico adverso y una SG significativamente más corta. Un análisis más detallado de las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas en el sCRC metastásico, permitió identificar un amplio abanico de genes que al estar codificados en las regiones cromosómicas delecionadas y ganadas de forma preferencial en este subgrupo de pacientes, podrían estar potencialmente relacionadas con un pronóstico más adverso de la enfermedad.

Estudios previos han puesto de manifiesto la existencia de una asociación significativa entre la presencia de pérdidas alélicas del cromosoma 1p en pacientes con sCRC metastásico y fenotipos más agresivos, incluyendo una SG significativamente más corta^{136, 137}; estos hallazgos están de acuerdo con nuestros resultados que mostraban una elevada frecuencia (>60%) de pérdidas a nivel de la región 1p33 entre los sCRC metastásicos, que suponía el doble de la encontrada en los tumores no metastásicos³¹⁹. En esta región cromosómica están codificados genes supresores de tumor como el gen *ELAVL4*, cuya baja expresión se ha relacionado con un peor pronóstico en otras neoplasias sólidas como los meningiomas³³¹.

En concordancia con lo descrito en el capítulo anterior y en publicaciones previas de nuestro grupo y de otros autores, el empleo de arrays de SNPs confirmó la asociación existente entre la del(17p) y i) el sCRC metastásico, ii) un pronóstico adverso en términos de SG^{319, 332}. Sin embargo, en esta deleción, además del gen *TP53*^{64, 102}, se afectaban también otros genes como el gen *COX10*, cuyo posible papel en el proceso metastásico sigue siendo desconocido.

El cromosoma 18 constituye uno de los cromosomas más estudiados en el sCRC, constituyendo la pérdida de su brazo largo -del(18q21)- una de las alteraciones más frecuentemente descritas en tumores colorrectales (50-70% de los casos)^{209, 217, 333}. En esta región cromosómica, se localizan los genes *DCC* y *SMAD4* implicados en la progresión del sCRC, y que se considera constituyen un biomarcador genético de estadio avanzado de la enfermedad. Hoy se sabe que en células normales, estos dos genes (*DCC* y *SMAD4*) juegan un importante papel en la inducción de apoptosis (*DCC*)^{334, 335} y la inhibición del crecimiento celular

(*SMAD4*), respectivamente¹²². Asimismo, nuestros hallazgos muestran la existencia de una mayor frecuencia de deleción de otras regiones del cromosoma 18 en tumores metastásicos vs. no metastásicos, deleciones que se asociaban también con un impacto pronóstico adverso sobre la SG. De ellas merece destacar la del(18q12-ter), descrita previamente como un factor pronóstico adverso independiente de otros parámetros en pacientes con sCRC en estadios avanzados de la enfermedad (estadios III y IV)³³⁶. De forma similar, la del(18q12.2) descrita por Pouligiannis *et al.* como asociada a metástasis, en nuestro trabajo mostró una mayor prevalencia entre sCRC que presentaban diseminación hepática del tumor al diagnóstico³²⁰. Precisamente en esta región del cromosoma 18 se encuentra codificado el gen *BRUNOL4*, cuya deleción ha sido considerada como un factor pronóstico adverso independiente en el sCRC³²⁰. Además, nuestros resultados muestran que en la región cromosómica delecionada a nivel de 18q22, a parte del gen *BRUNOL4*, se incluyen otros 5 genes que han sido relacionados con otros tumores, de los que merece destacar *MAPRE2*, *ZNF24* y *PIK3C3* asociados a tumores gastrointestinales e implicados en procesos metastásicos³³⁷⁻³⁴¹. Las pérdidas de las regiones cromosómicas 18q22 y 18q23, detectadas con mayor frecuencia en sCRC metastásicos vs. no metastásicos y asociadas en nuestra serie con un pronóstico desfavorable, han sido previamente relacionadas también en el sCRC con la presencia de metástasis ganglionares y hepáticas^{136, 320, 330, 342}. Además, el análisis mediante técnica de PCR de los genes *DNAM-1*, *SOCS6* y *CASI-7* localizados en ambas regiones cromosómicas, ha mostrado también la existencia de una asociación previamente también con un pronóstico adverso de la enfermedad, lo cual apoya nuestros resultados acerca de la posible relevancia clínica de ambas deleciones³⁴³.

Respecto a la ganancia de distintas regiones cromosómicas asociadas a tumores colorrectales metastásicos, cabe señalar en primer lugar la ganancia del cromosoma 7, especialmente cuando esta alteración afectan a la región 7p12, donde se encuentra localizado el gen *EGFR* involucrado en procesos de proliferación celular^{344, 345}. En la última década se han investigado en detalle las alteraciones del gen *EGFR* en el sCRC, al haberse asociado la existencia de amplificación de la región cromosómica 7p12 con la respuesta al tratamiento de estos tumores^{48, 62}. No obstante, la amplificación del cromosoma 7p12 no afecta de forma aislada al gen *EGFR*, sino que conlleva también la co-amplificación de genes adyacentes

como *SEC16G*, *LANCL2*, *VOPP1*, *PSPH* y *GBAS*, que a su vez se han asociado con el pronóstico de otros tumores, como el cáncer de mama o el glioblastoma^{346, 347}. En términos generales, nuestros resultados muestran que las ganancias que afectan a la región cromosómica 7q22, donde se encuentran codificados dos genes pertenecientes a la familia del citocromo p450 e implicados en el metabolismo de fármacos (*CYP3A5* y *CYP3A7*), constituyen una característica típica del sCRC metastásico y en especial, de aquellos casos que muestran un pronóstico más desfavorable. En este sentido, cabe señalar que en diferentes estudios se han observado niveles de expresión elevados de ambos genes en sCRC, además de en otros tipos de tumores, especialmente en tumores en estadios avanzados de la enfermedad y que presentan metástasis a distancia^{348, 349}. Finalmente, la ganancia de la región cromosómica 7q32, observada de forma predominante también entre los sCRC metastásicos, podría constituir otra alteración con impacto en la diseminación a distancia, ya que en ella se encuentra localizado el gen *PODXL* implicado en procesos de adhesión celular, y cuya posible participación en la diseminación a otros tejidos de las células tumorales de colon, además de la asociación con un pronóstico adverso, han sido referidas previamente en la bibliografía por otros autores³⁵⁰.

Además de las regiones cromosómicas ya mencionadas, en nuestra serie identificamos 9 regiones distintas del cromosoma 13q cuya ganancia se asoció con tumores metastásicos y un pronóstico adverso: 13q22 (73,603,130-73,627,939pb), 13q22 (74,962,410-76,366,765pb), 13q31 (79,803,335-79,845,948pb), 13q31 (90,792,026-90,867,353pb), 13q31 (92,522,499-92,673,304pb), 13q31 (92,852,858-92,917,452pb), 13q33 (102,999,018-105,259,754pb), 13q33 (108,337,015-109,286,583pb) y 13q34 (109,466,205-112,946,386pb). Sin embargo, un análisis más detallado de estas regiones del cromosoma 13 no nos ha permitido identificar en ellas ningún gen que se haya descrito previamente pudiera estar involucrado en el desarrollo y/o progresión del tumor. Aun así, estudios previos han referido también la existencia de una asociación significativa entre las anomalías numéricas de este cromosoma y la presencia de metástasis y/o una SG significativamente reducida en pacientes con sCRC, lo cual estaría de acuerdo con nuestros hallazgos^{219, 320, 351}.

En resumen, nuestros resultados basados en el empleo de arrays de SNPs de alta resolución, han permitido dibujar un mapa de las alteraciones en el número de copias del ADN del genoma completo del sCRC metastásico frente al de los tumores colorrectales no metastásico, y definir así, el perfil diferencial de alteraciones genéticas entre ambos subgrupos de sCRC y que incluía alteraciones en una o más regiones localizadas en los cromosomas 1p, 7, 13q, 17p y 18q. Dichas alteraciones afectaban a un número importante de genes que además de estar asociados con el proceso metastásico, mostraban también un impacto pronóstico desfavorable. No obstante, queda aún por dilucidar cual puede llegar a ser la función exacta que cada uno de estos genes candidatos pueda desempeñar en la diseminación metastásica del sCRC.

Vías de evolución clonal a nivel intra-tumoral y respuesta al tratamiento en el cáncer rectal localmente avanzado.

Hoy se conoce que el sCRC incluye un grupo amplio de tumores, a la vez muy heterogéneo a nivel genético, biológico e incluso clínico, y que a su vez muestran una respuesta al tratamiento y una supervivencia muy variables de unos pacientes a otros^{46, 48, 49}. Desde el punto de vista clínico, los pacientes con sCRC se dividen ya al diagnóstico en dos grandes grupos, según presenten metástasis sincrónicas o no; dentro de este último grupo, se incluye a su vez un subgrupo clínicamente muy relevante, formado por aquellos pacientes que presentan adenocarcinoma rectal localmente avanzado^{46, 48, 49}. La relevancia clínica de este último subgrupo de pacientes está directamente relacionada con el hecho de que se trata de pacientes que pueden beneficiarse de tratamiento radio-quimioterápico pre-operatorio (RQT), con una mejoría notable en su calidad de vida, asociada a la conservación de esfínteres, una menor tasa de recidiva y por lo tanto también, una SG más prolongada^{67, 68, 352}. Sin embargo, la respuesta a la RQT por parte del adenocarcinoma rectal localmente avanzado es, en términos generales, muy variable³⁵³, desconociéndose en la actualidad si las distintas alteraciones genéticas presentes en el tumor contribuyen a determinar o no su grado de sensibilidad vs. resistencia al tratamiento administrado.

Estudios previos han demostrado la existencia de una gran heterogeneidad genética tanto a nivel intra-tumoral como inter-tumoral, no solo en el sCRC en general, sino también de forma específica en el adenocarcinoma de recto^{204, 209, 354}. En base a estas premisas, planteamos como tercer objetivo de este trabajo, identificar los perfiles de alteraciones cromosómicas más frecuentes en el adenocarcinoma rectal localmente avanzado, definiendo para cada tumor las diferentes vías de evolución clonal a nivel intra-tumoral, con el fin de establecer su posible asociación e impacto en la respuesta al tratamiento neoadyuvante. La identificación de marcadores genéticos asociados a la respuesta a la RQT, permitiría conocer de forma temprana que pacientes serían sensibles vs. resistentes al tratamiento y con ello, realizar un abordaje terapéutico más personalizado de estos tumores. Para ello, investigamos mediante técnica de *i*FISH la presencia y frecuencia de las alteraciones cromosómicas más prevalentes en sCRC, en muestras pareadas de biopsia de tumores rectales localmente avanzados pre- y post-tratamiento RQT. El análisis simultáneo de las alteraciones presentes en ≥ 2 regiones cromosómicas en células tumorales individuales, nos permitió además establecer las diferentes vías de evolución clonal que coexisten dentro de cada tumor.

De acuerdo con hallazgos previos de otros autores, las alteraciones cromosómicas más prevalentes en los tumores de recto analizados al diagnóstico se traducían de forma sistemática en cariotipos complejos (típicamente) con más de tres alteraciones cromosómicas^{209, 293, 351}, siendo las ganancias de los cromosomas 7, 8q, 13q y 20q y las pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 8p, 17p y 18q, las alteraciones más frecuentemente encontradas^{209, 219, 305, 351, 355}. De todas ellas, la presencia en los clones ancestrales de cada tumor de alteraciones en las regiones cromosómicas 1p, 1q, 11p, 12p y 17p se asoció con distinto grado de respuesta a la RQT. Por el contrario, las alteraciones de las regiones cromosómicas 8q, 13q y 20q no mostraron una relación significativa con el grado de respuesta al tratamiento pre-operatorio.

Los tumores de recto localmente avanzados que presentaban resistencia a la RQT (grados 0 y 1 de Dworak) mostraban con mayor frecuencia del(17p) en el clon ancestral. La pérdida de 17p ha sido ampliamente descrita en el sCRC, en el que se ha relacionado, tanto con la presencia de metástasis, como con un pronóstico adverso^{219, 310}. Además, la del(17p) se ha asociado también con la presencia de mutaciones en el gen *TP53*, involucradas en la resistencia al tratamiento con fármacos citostáticos y/o con

antimetabolitos en pacientes con sCRC y otros tipos de tumores malignos³⁵⁶⁻³⁶⁰. Actualmente sabemos que la pérdida de funcionalidad de *TP53* no solo facilita el crecimiento del tumor y la progresión de la enfermedad, sino que además contribuye a explicar la ausencia de respuesta a la RQT en pacientes con adenocarcinomas de recto localmente avanzado que presentan *del(17p)*^{361, 362, 363}. En este sentido cabe señalar que, la *del(17p)* con frecuencia conlleva también la alteración de otros genes codificados en la vecindad de *TP53* como el gen *APRIL*, involucrado en procesos de proliferación celular y cuya expresión alterada se ha asociado en el sCRC con resistencia a tratamiento con 5-FU³⁶⁴, quedando por establecer si esta constituye un epifenómeno de la alteración de *TP53* o si por el contrario, juega un papel sinérgico con dicha alteración. Independientemente del gen o de los genes involucrados, estos hallazgos confirman la estrecha relación encontrada en nuestra serie entre la presencia de *del(17p)* y la resistencia a la RQT en tumores de recto localmente avanzados.

Además de la asociación descrita anteriormente entre la presencia de *del(17p)* y la resistencia a la RQT, nuestros resultados mostraron también una tasa de respuestas favorables a la RQT (grados 3 y 4 de Dworak) entre aquellos pacientes con adenocarcinoma rectal localmente avanzado que presentaban alteraciones del cromosoma 1 en el clon tumoral ancestral, en ausencia de *del(17p)*. La pérdida de la región cromosómica 1p asociada a pérdida simultánea de 19q, ha sido ampliamente estudiada en la bibliografía, y se ha relacionado con una mayor sensibilidad a la RQT en tumores oligodendrogiales^{365, 366}; en este subtipo de tumores en la *del(1p)* se ve implicado el gen *PRDX1* localizado a nivel de 1p34 e involucrado en procesos antioxidantes y citoprotectores³⁶⁵. Así mismo, en pacientes con gliomas la ganancia de la región cromosómica 1q24 se ha asociado con una respuesta más favorable a la quimioterapia en pacientes con glioma³⁶⁷, a la vez que se ha descrito también una asociación entre la ganancia del gen *ABL2*, codificado a nivel de la región cromosómica 1q25 y una mayor sensibilidad al tratamiento de tumores de pulmón de célula pequeña³⁶⁸. Especial interés reviste el grupo de pacientes analizados en nuestro trabajo que presentan respuesta parcial a la RQT (grado 2 de Dworak) ya que desde el punto de vista genético e histopatológico, este subgrupo de tumores se caracterizó por presentar una gran heterogeneidad con

clones tumorales ancestrales portadores de distintas alteraciones cromosómicas entre las que se incluían la del(1p) aislada o combinada con del(17p).

Finalmente, cabe señalar que en lo que respecta a las alteraciones de los cromosomas 11 y 12, no queda claro por ahora cuál pueda ser su papel en la respuesta al tratamiento neoadyuvante en tumores de recto localmente avanzados, ya que mientras en algunos estudios la pérdida de la región cromosómica 12p se ha relacionado con una respuesta completa a la RQT³⁰⁴, en nuestra serie esta alteración solo estaba presente en 1 de los 45 tumores (grado 3 de Dworak) analizados, siendo mucho más frecuentes las ganancias que las pérdidas de esta región cromosómica.

Al comparar muestras pareadas de biopsias pre- y post-RQT, observamos perfiles genéticos muy similares en ambas, si bien tras la RQT las células tumorales residuales mostraban una tendencia a presentar una frecuencia ligeramente incrementada de alteraciones cromosómicas. Así, en general, el clon tumoral predominante en el tejido de la biopsia pre-RQT seguía estando muy representado tras el tratamiento. No obstante esta regla general, en un subgrupo de alrededor del 20% de los pacientes, observamos como clones que eran minoritarios al diagnóstico, se convertían en los clones más prevalentes en las muestras obtenidas tras RQT. Estos hallazgos citogenéticos están de acuerdo con lo observado también en muestras pareadas pre- y post-tratamiento neoadyuvante en otros tipos de neoplasias, como tumores de ovario, cuello uterino o hemopatías malignas, en las que de forma recurrente se ha descrito la adquisición de nuevas alteraciones genéticas y la selección clonal^{293, 369-372}. Sin embargo, no podemos descartar que las variaciones en el tamaño de los clones identificados puedan deberse a una distribución heterogénea de los distintos clones de células tumorales en diferentes áreas del tumor^{195, 204, 354, 373}. Además, las muestras tumorales obtenidas post-tratamiento, independientemente del grado de respuesta a la RQT, presentaban entre otras alteraciones cromosómicas adicionales, ganancias de los cromosomas 8q, 13q y 20q, alteraciones fuertemente asociadas en el sCRC con fenotipos más agresivos y progresión tumoral^{217, 219, 374}. El verdadero significado de la adquisición de múltiples copias de estas tres regiones cromosómicas, y su implicación en la respuesta a la RQT en tumores de recto localmente avanzados, queda de momento por esclarecer de forma definitiva.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que en el adenocarcinoma rectal localmente avanzado la respuesta al tratamiento neoadyuvante estaría directamente relacionada con el perfil citogenético de las células tumorales al diagnóstico, al asociarse la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas como la del(1p), y la del(17p) por un lado, y la ganancia de 1q por otra parte, con distinto grado de sensibilidad y resistencia a la RQT administrada; el posible significado clínico de las ganancias de los cromosomas 8q, 13q y 20q, observadas tras el tratamiento queda de momento por establecerse de forma definitiva.

CONCLUSIONES

En relación con el valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas asociadas al sCRC metastásico:

1. Los tumores colorrectales metastásicos y no metastásicos muestran perfiles citogenéticos parecidos, caracterizados por pérdidas a nivel de las regiones cromosómicas 1p, 8p, 14q, 18q y ganancias del cromosoma 7, 13q y 20q. No obstante, los adenocarcinomas metastásicos muestran una frecuencia significativamente superior de algunas alteraciones cromosómicas típicas del clon tumoral ancestral como la del(22q) y la del(17p), especialmente cuando el punto de ruptura en esta última se localiza en la región 17p11.2, sugiriendo que ambas alteraciones, cuando están presentes, puedan jugar un papel relevante en el proceso metastásico.
2. Tanto la del(17p), especialmente cuando afecta al punto de ruptura 17p11.2, como la del(22q) se asocian en el sCRC a un pronóstico adverso, reflejado en una SG significativamente más corta, pudiendo potencialmente contribuir en el futuro, a una mejor estratificación pronóstica de los pacientes ya en el momento del diagnóstico.

En relación con los perfiles genéticos del sCRC metastásico y su posible impacto pronóstico:

3. El empleo de arrays de SNPs de alta resolución ha permitido un análisis detallado del número de copias de ADN de todo el genoma del sCRC metastásico y no metastásico, ampliando el número de alteraciones comunes y distintas a estos dos grupos de tumores, respecto a las encontradas por *i*FISH. Así, ambos grupos de tumores presentan un perfil genético asociado a pérdida de las regiones cromosómicas 3p, 5q, 8p, 10q, 14q, 15q y 22q, y ganancia de 1q, 2p, 3q, 5p, 6q, 11p y 20q, difiriendo entre sí en la frecuencia de alteración en 58 regiones cromosómicas, entre las que se incluyen de forma característica pérdidas a nivel de 1p, 17p y 18q y ganancias en los cromosomas 7 y 13q.
4. De las 58 regiones cromosómicas cuya alteración se ha asociado de forma característica a tumores sCRC metastásicos, 19 de las que se encontraban más frecuentemente delecionadas y 23 de las ganadas, se asociaban con una SG significativamente acortada. Estos hallazgos ponen de manifiesto la utilidad de los arrays de SNPs de alta resolución para una caracterización más detallada de los perfiles

del genoma global del sCRC metastásico vs. no metastásico y la identificación de un mayor número de marcadores genómicos con impacto pronóstico en esta neoplasia.

En relación con la posible asociación existente entre alteraciones cromosómicas y vías de evolución clonal presentes a nivel intra-tumoral en el cáncer rectal localmente avanzado y la respuesta al tratamiento pre-operatorio:

5. Al diagnóstico el carcinoma rectal localmente avanzado muestra una elevada frecuencia de cariotipos complejos, asociados a una gran heterogeneidad genética tanto a nivel intra-tumoral como inter-tumoral, constituyendo las pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 8p, 17p y 18, y las ganancias de los cromosomas 7, 8q, 13q y 20q, las alteraciones más frecuentes.
6. A nivel intra-tumoral, los clones ancestrales de los tumores de recto localmente avanzados estudiados al diagnóstico presentaban con relativa frecuencia pérdida de las regiones cromosómicas 1p, 17p y/o ganancias de 8q, 11p, 12p y 13q, lo cual sugiere se trata de alteraciones cromosómicas que ocurrirían ya en las primeras etapas del desarrollo del tumor.
7. De todas de las alteraciones identificadas en el cáncer de recto localmente avanzado de forma previa a la administración de la RQT pre-operatoria, las pérdidas de las regiones 1p y 17p, junto con las ganancias de 11p y 12p, fueron las únicas anomalías que se asociaron con el grado de respuesta local al tratamiento. Así, aquellos pacientes que presentaban del(1p) de forma aislada o en combinación con otras alteraciones, mostraban una mayor sensibilidad al tratamiento neoadyuvante, mientras que la del(17p) se asoció con una peor respuesta al mismo, lo cual pone de manifiesto la relevancia del perfil genético del tumor a la hora de determinar el grado de respuesta al tratamiento neoadyuvante administrado habitualmente a estos pacientes .
8. En general, tras la administración de RQT de forma previa a la cirugía se mantiene el patrón de distribución de los distintos clones tumorales observados al diagnóstico; no obstante, en aproximadamente el 20% de los casos tras el tratamiento, predominan clones que eran minoritarios al diagnóstico, asociado a un aumento significativo en el número de alteraciones genéticas que afectan a

las regiones cromosómicas 8q, 13q y 20q, lo cual sugiere la coexistencia en un mismo tumor de clones con diferente grado de sensibilidad y resistencia al tratamiento.

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017 May 06; **67**(3): 177-193.
2. Rotolo N, De Monte L, Imperatori A, Dominioni L. Pulmonary resections of single metastases from colorectal cancer. *Surg Oncol* 2007 Dec; **16 Suppl 1**: S141-144.
3. Kelly ME, Spolverato G, Le GN, Mavros MN, Doyle F, Pawlik TM, *et al.* Synchronous colorectal liver metastasis: a network meta-analysis review comparing classical, combined, and liver-first surgical strategies. *J Surg Oncol* 2015 Mar; **111**(3): 341-351.
4. McMillan DC, McArdle CS. Epidemiology of colorectal liver metastases. *Surg Oncol* 2007 Jul; **16**(1): 3-5.
5. Organization WH (ed). *WHO (1981) International Histological Classification of Tumors V-G*: Berlin, 1988–1992. 1967–1981pp
6. Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer* 2005 Mar; **5**(3): 199-209.
7. Swiderska M, Choromanska B, Dabrowska E, Konarzewska-Duchnowska E, Choromanska K, Szczurko G, *et al.* The diagnostics of colorectal cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 2014; **18**(1): 1-6.
8. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, *et al.* Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 2008 May; **134**(5): 1570-1595.
9. Song LL, Li YM. Current noninvasive tests for colorectal cancer screening: An overview of colorectal cancer screening tests. *World J Gastrointest Oncol* 2016 Nov 15; **8**(11): 793-800.
10. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, *et al.* ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006 Nov 20; **24**(33): 5313-5327.
11. 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 Apr; **22**(2): 89-93.
12. Sorbye H, Dahl O. Carcinoembryonic antigen surge in metastatic colorectal cancer patients responding to oxaliplatin combination chemotherapy: implications for tumor marker monitoring and guidelines. *J Clin Oncol* 2003 Dec 01; **21**(23): 4466-4467.
13. Paspulati RM, Partovi S, Herrmann KA, Krishnamurthi S, Delaney CP, Nguyen NC. Comparison of hybrid FDG PET/MRI compared with PET/CT in colorectal cancer staging and restaging: a pilot study. *Abdom Imaging* 2015 Aug; **40**(6): 1415-1425.

14. Mainenti PP, Romano F, Pizzuti L, Segreto S, Storto G, Mannelli L, *et al.* Non-invasive diagnostic imaging of colorectal liver metastases. *World J Radiol* 2015 Jul 28; **7**(7): 157-169.
15. Brendle C, Schwenzer NF, Rempp H, Schmidt H, Pfannenbergl C, la Fougere C, *et al.* Assessment of metastatic colorectal cancer with hybrid imaging: comparison of reading performance using different combinations of anatomical and functional imaging techniques in PET/MRI and PET/CT in a short case series. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016 Jan; **43**(1): 123-132.
16. Cartana ET, Gheonea DI, Saftoiu A. Advances in endoscopic ultrasound imaging of colorectal diseases. *World J Gastroenterol* 2016 Feb 07; **22**(5): 1756-1766.
17. Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello FM, Johnson DA, Levin TR. Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2012 Sep; **143**(3): 844-857.
18. 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 Aug 15; **8**(33): 55632-55645.
19. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, *et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004 Aug 19; **351**(8): 781-791.
20. Heller G, Fizazi K, McCormack R, Molina A, MacLean D, Webb IJ, *et al.* The Added Value of Circulating Tumor Cell Enumeration to Standard Markers in Assessing Prognosis in a Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Population. *Clin Cancer Res* 2017 Apr 15; **23**(8): 1967-1973.
21. McDaniel AS, Ferraldeschi R, Krupa R, Landers M, Graf R, Louw J, *et al.* Phenotypic diversity of circulating tumour cells in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int* 2017 Nov; **120**(5B): E30-E44.
22. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, *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 Jul 01; **26**(19): 3213-3221.
23. Zhao R, Cai Z, Li S, Cheng Y, Gao H, Liu F, *et al.* Expression and clinical relevance of epithelial and mesenchymal markers in circulating tumor cells from colorectal cancer. *Oncotarget* 2017 Feb 07; **8**(6): 9293-9302.
24. Lecomte T, Ceze N, Dorval E, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol* 2010 Dec; **34**(12): 662-681.

25. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011 Jun; **11**(6): 426-437.
26. Fleischhacker M, Schmidt B. Cell-free DNA resuscitated for tumor testing. *Nat Med* 2008 Sep; **14**(9): 914-915.
27. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, *et al.* Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014 Apr; **20**(4): 430-435.
28. Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G, *et al.* Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015 Jul 14; **113**(2): 275-281.
29. Chen Y, Xie Y, Xu L, Zhan S, Xiao Y, Gao Y, *et al.* Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics. *Int J Cancer* 2017 Feb 15; **140**(4): 900-913.
30. Gao P, Song YX, Wang ZN, Xu YY, Tong LL, Zhu JL, *et al.* Integrated ratio of metastatic to examined lymph nodes and number of metastatic lymph nodes into the AJCC staging system for colon cancer. *PLoS One* 2012; **7**(4): e35021.
31. Fonseca GM, Herman P, Faraj SF, Kruger JAP, Coelho FF, Jeismann VB, *et al.* Pathological factors and prognosis of resected liver metastases of colorectal carcinoma: implications and proposal for a pathological reporting protocol. *Histopathology* 2017 Aug 31.
32. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. *Cancer Manag Res* 2014; **6**: 291-300.
33. Smith MD, McCall JL. Systematic review of tumour number and outcome after radical treatment of colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2009 Oct; **96**(10): 1101-1113.
34. Mukkai Krishnamurthy D, Wise PE. Importance of surgical margins in rectal cancer. *J Surg Oncol* 2016 Mar; **113**(3): 323-332.
35. Sinicrope FA, Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Curr Opin Oncol* 2009 Jul; **21**(4): 369-373.
36. 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 Jun 28; **115**(1): 25-33.
37. 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 Dec; **6**(6): 660-667.

38. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Expanding Role of Microsatellite Instability in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancers. *J Gastrointest Cancer* 2017 Dec; **48**(4): 305-313.
39. Cicenás J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, Tarvydas R, Staniute G, Kalyan K, *et al.* KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Med Oncol* 2017 Feb; **34**(2): 26.
40. 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* 2014 Jul; **53**(7): 852-864.
41. 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 Jun; **96**(22): e7051.
42. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, *et al.* Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* 2010 Dec; **222**(4): 350-366.
43. 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 Jul; **38**(1): 3-15.
44. Zhang X, Kelaria S, Kerstetter J, Wang J. The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Oncol* 2015 Jun; **6**(3): 307-313.
45. 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 Oct; **137**(4): 1270-1279.
46. Burt RW, Barthel JS, Dunn KB, David DS, Drelichman E, Ford JM, *et al.* NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening. *J Natl Compr Canc Netw* 2010 Jan; **8**(1): 8-61.
47. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, *et al.* Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008 Apr 20; **26**(12): 2006-2012.
48. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB, 3rd, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, *et al.* NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2009 Sep; **7**(8): 778-831.
49. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB, 3rd, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, *et al.* NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: rectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2009 Sep; **7**(8): 838-881.
50. Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003 Aug 10; **106**(1): 66-73.

51. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, *et al.* The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer* 2009 Feb; **45**(3): 365-373.
52. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Osterlund P, Greil R, Van Cutsem E, *et al.* Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013 Jan; **14**(1): 29-37.
53. Feng QY, Wei Y, Chen JW, Chang WJ, Ye LC, Zhu DX, *et al.* Anti-EGFR and anti-VEGF agents: important targeted therapies of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 2014 Apr 21; **20**(15): 4263-4275.
54. Miyamoto Y, Suyama K, Baba H. Recent Advances in Targeting the EGFR Signaling Pathway for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017 Apr 02; **18**(4).
55. Price TJ, Peeters M, Kim TW, Li J, Cascinu S, Ruff P, *et al.* Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol* 2014 May; **15**(6): 569-579.
56. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, *et al.* Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013 Jan 26; **381**(9863): 303-312.
57. Fakih MG. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions. *J Clin Oncol* 2015 Jun 01; **33**(16): 1809-1824.
58. Ochendusko SL, Krzemieniecki K. Targeted therapy in advanced colorectal cancer: more data, more questions. *Anticancer Drugs* 2010 Sep; **21**(8): 737-748.
59. 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 Jun; **12**(6): 594-603.
60. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, *et al.* PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009 Mar 01; **69**(5): 1851-1857.
61. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008 Mar 13; **358**(11): 1160-1174.

62. Di Fiore F, Sesboue R, Michel P, Sabourin JC, Frebourg T. Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010 Dec 07; **103**(12): 1765-1772.
63. Cai ZX TX, Gao HL, Tang C, Nandakumar V, et al. . APC, FBXW7, KRAS, PIK3CA, and TP53 Gene Mutations in Human Colorectal Cancer Tumors Frequently Detected by Next-Generation DNA Sequencing. *J Mol Genet Med* 2014; **8**(145).
64. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol* 2015 Jan 07; **21**(1): 84-93.
65. Iacopetta B, Russo A, Bazan V, Dardanoni G, Gebbia N, Soussi T, et al. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Ann Oncol* 2006 May; **17**(5): 842-847.
66. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* 2016 Feb 15; **22**(4): 813-820.
67. Theodoropoulos G, Wise WE, Padmanabhan A, Kerner BA, Taylor CW, Aguilar PS, et al. T-level downstaging and complete pathologic response after preoperative chemoradiation for advanced rectal cancer result in decreased recurrence and improved disease-free survival. *Dis Colon Rectum* 2002 Jul; **45**(7): 895-903.
68. Rodel C, Martus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005 Dec 1; **23**(34): 8688-8696.
69. de Campos-Lobato LF, Stocchi L, da Luz Moreira A, Geisler D, Dietz DW, Lavery IC, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant treatment for rectal cancer decreases distant recurrence and could eradicate local recurrence. *Ann Surg Oncol* 2011 Jun; **18**(6): 1590-1598.
70. Therasse P, Arbutk SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000 Feb 02; **92**(3): 205-216.
71. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997; **12**(1): 19-23.
72. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001 Jul; **121**(1): 198-213.
73. Pineda M, Gonzalez S, Lazaro C, Blanco I, Capella G. Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res* 2010 Nov 10; **693**(1-2): 19-31.

74. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996 Oct 18; **87**(2): 159-170.
75. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004 Oct; **4**(10): 769-780.
76. Macaron C, Heald B, Burke CA. Using Genetics to Identify Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes in Your Patient. *Curr Gastroenterol Rep* 2015 Oct; **17**(10): 463.
77. Lynch HT, Guirgis HA, Lynch PM, Lynch JF, Harris RE. Familial cancer syndromes: a survey. *Cancer* 1977 Apr; **39**(4 Suppl): 1867-1881.
78. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, *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 Aug; **147**(2): 502-526.
79. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004 Feb; **4**(2): 153-158.
80. Yurgelun MB, Goel A, Hornick JL, Sen A, Turgeon DK, Ruffin MT, *et al.* Microsatellite instability and DNA mismatch repair protein deficiency in Lynch syndrome colorectal polyps. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012 Apr; **5**(4): 574-582.
81. Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer* 2006; **5**(3): 221-226.
82. Waller A, Findeis S, Lee MJ. Familial Adenomatous Polyposis. *J Pediatr Genet* 2016 Jun; **5**(2): 78-83.
83. 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 Mar 28; **92**(7): 3046-3050.
84. McGarrity TJ, Amos C. Peutz-Jeghers syndrome: clinicopathology and molecular alterations. *Cell Mol Life Sci* 2006 Sep; **63**(18): 2135-2144.
85. Yoo LI, Chung DC, Yuan J. LKB1--a master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat Rev Cancer* 2002 Jul; **2**(7): 529-535.
86. Wirtzfeld DA, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA. Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Ann Surg Oncol* 2001 May; **8**(4): 319-327.

87. Schultz KAP, Rednam SP, Kamihara J, Doros L, Achatz MI, Wasserman JD, *et al.* PTEN, DICER1, FH, and Their Associated Tumor Susceptibility Syndromes: Clinical Features, Genetics, and Surveillance Recommendations in Childhood. *Clin Cancer Res* 2017 Jun 15; **23**(12): e76-e82.
88. Brosens LA, Langeveld D, van Hattem WA, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Juvenile polyposis syndrome. *World J Gastroenterol* 2011 Nov 28; **17**(44): 4839-4844.
89. Dominguez-Valentin M, Therkildsen C, Veerla S, Jonsson M, Bernstein I, Borg A, *et al.* Distinct gene expression signatures in lynch syndrome and familial colorectal cancer type x. *PLoS One* 2013; **8**(8): e71755.
90. Francisco I, Albuquerque C, Lage P, Belo H, Vitoriano I, Filipe B, *et al.* Familial colorectal cancer type X syndrome: two distinct molecular entities? *Fam Cancer* 2011 Dec; **10**(4): 623-631.
91. Sanchez-Tome E, Rivera B, Perea J, Pita G, Rueda D, Mercadillo F, *et al.* Genome-wide linkage analysis and tumoral characterization reveal heterogeneity in familial colorectal cancer type X. *J Gastroenterol* 2015 Jun; **50**(6): 657-666.
92. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 Jun 01; **61**(5): 759-767.
93. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013 Mar 29; **339**(6127): 1546-1558.
94. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002 Jul; **89**(7): 845-860.
95. Pathak S. Cytogenetics of epithelial malignant lesions. *Cancer* 1992 Sep 15; **70**(6 Suppl): 1660-1670.
96. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004 Jan-Jun; **23**(1-2): 11-27.
97. Chiang JM, Chou YH, Chou TB. K-ras codon 12 mutation determines the polypoid growth of colorectal cancer. *Cancer Res* 1998 Aug 01; **58**(15): 3289-3293.
98. Al-Shamsi HO, Jones J, Fahmawi Y, Dahbour I, Tabash A, Abdel-Wahab R, *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 Dec; **7**(6): 882-902.
99. 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 Sep 23; **16**(9): 22976-22988.

100. Lin G, Zheng XW, Li C, Chen Q, Ye YB. KRAS mutation and NF-kappaB activation indicates tolerance of chemotherapy and poor prognosis in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2012 Sep; **57**(9): 2325-2333.
101. Caron de Fromental C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 1992 Jan; **4**(1): 1-15.
102. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989 Apr 14; **244**(4901): 217-221.
103. Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Hemminki K, Kumar R, *et al.* Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis* 2012 Mar; **27**(2): 211-218.
104. Hermsen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciotto A, *et al.* Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002 Oct; **123**(4): 1109-1119.
105. 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 Nov; **147**(1): 44-49.
106. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N. 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 Oct 20; **23**(30): 7518-7528.
107. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000 Nov 16; **408**(6810): 307-310.
108. Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci* 2015 Mar; **60**(3): 762-772.
109. Sefrioui D, Vermeulin T, Blanchard F, Chapusot C, Beaussire L, Armengol-Debeir L, *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 Apr 01; **140**(7): 1653-1661.
110. Risques RA, Ribas M, Peinado MA. Assessment of cumulated genetic alterations in colorectal cancer. *Histol Histopathol* 2003 Oct; **18**(4): 1289-1299.
111. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppede F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 792362.
112. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003 Sep; **3**(9): 695-701.

113. Wang H, Liang L, Fang JY, Xu J. Somatic gene copy number alterations in colorectal cancer: new quest for cancer drivers and biomarkers. *Oncogene* 2016 Apr 21; **35**(16): 2011-2019.
114. Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, *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 Dec; **51**(12): 901-909.
115. Burgess AW, Faux MC, Layton MJ, Ramsay RG. Wnt signaling and colon tumorigenesis--a view from the periphery. *Exp Cell Res* 2011 Nov 15; **317**(19): 2748-2758.
116. Grossmann AH, Samowitz WS. Epidermal growth factor receptor pathway mutations and colorectal cancer therapy. *Arch Pathol Lab Med* 2011 Oct; **135**(10): 1278-1282.
117. Loo LW, Tiirikainen M, Cheng I, Lum-Jones A, Seifried A, Church JM, *et al.* Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2013 May; **52**(5): 450-466.
118. Kruszewski W, Kowara R, Rzepko R, Warezak C, Zielinski J, Gryglewski G, *et al.* K-RAS point mutation, and amplification of C-MYC and C-ERBB2 in colon adenocarcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2004; **42**(3): 173-179.
119. Zhang C, Zhang S, Zhang D, Zhang Z, Xu Y, Liu S. A lung cancer gene GPC5 could also be crucial in breast cancer. *Mol Genet Metab* 2011 May; **103**(1): 104-105.
120. Carvalho B, Postma C, Mongera S, Hopmans E, Diskin S, van de Wiel MA, *et al.* Multiple putative oncogenes at the chromosome 20q amplicon contribute to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut* 2009 Jan; **58**(1): 79-89.
121. Malapelle U, Pisapia P, Sgariglia R, Vigliar E, Biglietto M, Carlomagno C, *et al.* Less frequently mutated genes in colorectal cancer: evidences from next-generation sequencing of 653 routine cases. *J Clin Pathol* 2016 Sep; **69**(9): 767-771.
122. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, *et al.* SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res* 2013 Jan 15; **73**(2): 725-735.
123. Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, Massague J, Thiagalingam S, Kinzler KW, *et al.* Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition in a Smad4 mutant colon adenoma cell line. *Cancer Res* 2001 Jan 01; **61**(1): 256-260.
124. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007 Jul 28; **13**(28): 3784-3791.

125. de Miranda NF, van Dinther M, van den Akker BE, van Wezel T, ten Dijke P, Morreau H. Transforming Growth Factor beta Signaling in Colorectal Cancer Cells With Microsatellite Instability Despite Biallelic Mutations in TGFBR2. *Gastroenterology* 2015 Jun; **148**(7): 1427-1437 e1428.
126. Shima K, Morikawa T, Yamauchi M, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, *et al.* TGFBR2 and BAX mononucleotide tract mutations, microsatellite instability, and prognosis in 1072 colorectal cancers. *PLoS One* 2011; **6**(9): e25062.
127. Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming Growth Factor beta Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2017 Jan; **152**(1): 36-52.
128. Bellam N, Pasche B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat Res* 2010; **155**: 85-103.
129. Ahadova A, von Knebel Doeberitz M, Blaker H, Kloor M. CTNNB1-mutant colorectal carcinomas with immediate invasive growth: a model of interval cancers in Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2016 Oct; **15**(4): 579-586.
130. Seo JO, Han SI, Lim SC. Role of CDK8 and beta-catenin in colorectal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2010 Jul; **24**(1): 285-291.
131. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 2010 Apr; **25**(2): 85-101.
132. Yang ZY, Shen WX, Hu XF, Zheng DY, Wu XY, Huang YF, *et al.* EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis. *J Hematol Oncol* 2012 Aug 16; **5**: 52.
133. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2014; **4**: 35.
134. Kothari N, Teer JK, Abbott AM, Srikumar T, Zhang Y, Yoder SJ, *et al.* Increased incidence of FBXW7 and POLE proofreading domain mutations in young adult colorectal cancers. *Cancer* 2016 Sep 15; **122**(18): 2828-2835.
135. Chang CC, Lin HH, Lin JK, Lin CC, Lan YT, Wang HS, *et al.* FBXW7 mutation analysis and its correlation with clinicopathological features and prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers* 2015 Feb 24; **30**(1): e88-95.
136. Knosel T, Schluns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, *et al.* Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia* 2004 Jan-Feb; **6**(1): 23-28.
137. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Fleshman JW, *et al.* Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. *Gastroenterology* 1997 Sep; **113**(3): 761-766.

138. Fujita S, Baba H, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y, Sugano K. Allelic status of chromosomes 17p, 18q, 22q [corrected] 3p and their clinical usefulness in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2006 Jul-Aug; **26**(4B): 2833-2840.
139. Arends MJ. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013 Mar; **21**(2): 97-102.
140. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2012 Sep; **27**(9): 1423-1431.
141. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999 Mar; **35**(3): 335-351.
142. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* 2016 Mar; **13**(1): 120-135.
143. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010 Jun; **138**(6): 2059-2072.
144. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 2009 Jul 09; **460**(7252): 278-282.
145. Katayama H, Ota T, Jisaki F, Ueda Y, Tanaka T, Odashima S, *et al.* Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1999 Jul 07; **91**(13): 1160-1162.
146. Plentz RR, Wiemann SU, Flemming P, Meier PN, Kubicka S, Kreipe H, *et al.* Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut* 2003 Sep; **52**(9): 1304-1307.
147. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001 Mar; **27**(3): 247-254.
148. Sameer AS, Nissar S, Fatima K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 2014 Jul; **23**(4): 246-257.
149. Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, *et al.* Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999 Aug 04; **91**(15): 1295-1303.
150. 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 Jul; **145**(1): 148-156.

151. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jul 20; **96**(15): 8681-8686.
152. Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, Jiang L, *et al.* MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PLoS One* 2013; **8**(3): e59064.
153. Bardhan K, Liu K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers (Basel)* 2013 Jun 05; **5**(2): 676-713.
154. Vedeld HM, Merok M, Jeanmougin M, Danielsen SA, Honne H, Presthus GK, *et al.* CpG island methylator phenotype identifies high risk patients among microsatellite stable BRAF mutated colorectal cancers. *Int J Cancer* 2017 Sep 01; **141**(5): 967-976.
155. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012 Jul 18; **487**(7407): 330-337.
156. Abetov D, Mustapova Z, Saliev T, Bulanin D. Biomarkers and signaling pathways of colorectal cancer stem cells. *Tumour Biol* 2015 Mar; **36**(3): 1339-1353.
157. Hagland HR, Berg M, Jolma IW, Carlsen A, Soreide K. Molecular pathways and cellular metabolism in colorectal cancer. *Dig Surg* 2013; **30**(1): 12-25.
158. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* 2014 Nov 15; **120**(22): 3446-3456.
159. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008 Apr; **4**(2): 68-75.
160. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2012 Feb; **142**(2): 219-232.
161. Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, *et al.* Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 2007 May 18; **316**(5827): 1043-1046.
162. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 2011 Sep; **138**(17): 3593-3612.
163. Vinson KE, George DC, Fender AW, Bertrand FE, Sigounas G. The Notch pathway in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2016 Apr 15; **138**(8): 1835-1842.

164. 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 Nov; **116**(11): 2517-2527.
165. Wu WK, Wang XJ, Cheng AS, Luo MX, Ng SS, To KF, *et al.* Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013 Jun; **86**(3): 251-277.
166. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 2008 Sep 15; **22**(18): 2454-2472.
167. Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010 Jun 15; **16**(12): 3130-3140.
168. Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, *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 Sep; **1**(6-7): 338-351.
169. Zhang X, Zhang SS, Wei GJ, Deng ZM, 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.
170. Hong KD, Lee Y, Kim BH, Lee SI, 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 Feb; **79**(2): 198-204.
171. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Cespedes MV, *et al.* Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 2012 Nov 13; **22**(5): 571-584.
172. Ramamoorthi G, Sivalingam N. Molecular mechanism of TGF-beta signaling pathway in colon carcinogenesis and status of curcumin as chemopreventive strategy. *Tumour Biol* 2014 Aug; **35**(8): 7295-7305.
173. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003 Oct 09; **425**(6958): 577-584.
174. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008 Jul 25; **134**(2): 215-230.
175. McKay JA, Murray LJ, Curran S, Ross VG, Clark C, Murray GI, *et al.* Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002 Nov; **38**(17): 2258-2264.
176. Mousa L, Salem ME, Mikhail S. Biomarkers of Angiogenesis in Colorectal Cancer. *Biomark Cancer* 2015; **7**(Suppl 1): 13-19.

177. Eveno C, Pocard M. VEGF levels and the angiogenic potential of the microenvironment can affect surgical strategy for colorectal liver metastasis. *Cell Adh Migr* 2012 Nov-Dec; **6**(6): 569-573.
178. Evans C, Dalgleish AG, Kumar D. Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Oct 15; **24**(8): 1163-1177.
179. Donovan EA, Kummar S. Role of insulin-like growth factor-1R system in colorectal carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008 May; **66**(2): 91-98.
180. Li ZJ, Ying XJ, Chen HL, Ye PJ, Chen ZL, Li G, *et al.* Insulin-like growth factor-1 induces lymphangiogenesis and facilitates lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2013 Nov 21; **19**(43): 7788-7794.
181. Livingstone C. IGF2 and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2013 Dec; **20**(6): R321-339.
182. Farooq A, Zhou MM. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 2004 Jul; **16**(7): 769-779.
183. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008 Sep 18; **27**(41): 5497-5510.
184. Bohn BA, Mina S, Krohn A, Simon R, Kluth M, Harasimowicz S, *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 Aug; **44**(8): 1524-1533.
185. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001 Jun; **13**(3): 332-337.
186. Zhu ZZ, Liu B, Wang AZ, Jia HR, Jin XX, He XL, *et al.* Association of p53 codon 72 polymorphism with liver metastases of colorectal cancers positive for p53 overexpression. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008 Nov; **9**(11): 847-852.
187. Vaiopoulos AG, Athanasoula K, Papavassiliou AG. NF-kappaB in colorectal cancer. *J Mol Med (Berl)* 2013 Sep; **91**(9): 1029-1037.
188. Gambhir S, Vyas D, Hollis M, Aekka A, Vyas A. Nuclear factor kappa B role in inflammation associated gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol* 2015 Mar 21; **21**(11): 3174-3183.
189. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol* 2009 Oct; **6**(5): 327-334.

190. Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2010 Feb 16; **102**(4): 639-644.
191. Tuncer S, Banerjee S. Eicosanoid pathway in colorectal cancer: Recent updates. *World J Gastroenterol* 2015 Nov 07; **21**(41): 11748-11766.
192. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, *et al.* The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009 Mar; **30**(3): 377-386.
193. Barranha R, Costa JL, Carneiro F, Machado JC. Genetic Heterogeneity in Colorectal Cancer and its Clinical Implications. *Acta Med Port* 2015 May-Jun; **28**(3): 370-375.
194. Blanco-Calvo M, Concha A, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *Int J Mol Sci* 2015 Jun 15; **16**(6): 13610-13632.
195. Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res* 2012 Oct 1; **72**(19): 4875-4882.
196. Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 2005 May; **26**(5): 916-922.
197. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976 Oct 01; **194**(4260): 23-28.
198. Sievers CK, Zou LS, Pickhardt PJ, Matkowskyj KA, Albrecht DM, Clipson L, *et al.* Subclonal diversity arises early even in small colorectal tumours and contributes to differential growth fates. *Gut* 2016 Sep 08.
199. Cross W, Graham TA, Wright NA. New paradigms in clonal evolution: punctuated equilibrium in cancer. *J Pathol* 2016 Oct; **240**(2): 126-136.
200. Bell DW. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *J Pathol* 2010 Jan; **220**(2): 231-243.
201. Lu YW, Zhang HF, Liang R, Xie ZR, Luo HY, Zeng YJ, *et al.* Colorectal Cancer Genetic Heterogeneity Delineated by Multi-Region Sequencing. *PLoS One* 2016; **11**(3): e0152673.
202. Sottoriva A, Kang H, Ma Z, Graham TA, Salomon MP, Zhao J, *et al.* A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet* 2015 Mar; **47**(3): 209-216.
203. Neelakantan D, Drasin DJ, Ford HL. Intratumoral heterogeneity: Clonal cooperation in epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis. *Cell Adh Migr* 2015; **9**(4): 265-276.

204. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012 Jan 18; **481**(7381): 306-313.
205. Tauriello DVF, Batlle E. Targeting the Microenvironment in Advanced Colorectal Cancer. *Trends Cancer* 2016 Sep; **2**(9): 495-504.
206. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, Krebs P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2016; **6**: 96.
207. Kim TM, Jung SH, An CH, Lee SH, Baek IP, Kim MS, *et al.* Subclonal Genomic Architectures of Primary and Metastatic Colorectal Cancer Based on Intratumoral Genetic Heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2015 Oct 01; **21**(19): 4461-4472.
208. 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 Dec; **6**(6): 668-675.
209. Sayagues JM, Abad Mdel M, Melchor HB, Gutierrez ML, Gonzalez-Gonzalez M, Jensen E, *et al.* Intratumoural cytogenetic heterogeneity of sporadic colorectal carcinomas suggests several pathways to liver metastasis. *J Pathol* 2010 Jul; **221**(3): 308-319.
210. Sipos F, Constantinovits M, Muzes G. Intratumoral functional heterogeneity and chemotherapy. *World J Gastroenterol* 2014 Mar 14; **20**(10): 2429-2432.
211. Zhai Z, Yu X, Yang B, Zhang Y, Zhang L, Li X, *et al.* Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: Clinical implications, challenges and solutions for treatment resistance. *Semin Cell Dev Biol* 2017 Apr; **64**: 107-115.
212. 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.
213. Vignot S, Lefebvre C, Frampton GM, Meurice G, Yelensky R, Palmer G, *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 May; **51**(7): 791-799.
214. Xie T, Cho YB, Wang K, Huang D, Hong HK, Choi YL, *et al.* Patterns of somatic alterations between matched primary and metastatic colorectal tumors characterized by whole-genome sequencing. *Genomics* 2014 Oct; **104**(4): 234-241.
215. Lee SY, Haq F, Kim D, Jun C, Jo HJ, Ahn SM, *et al.* Comparative genomic analysis of primary and synchronous metastatic colorectal cancers. *PLoS One* 2014; **9**(3): e90459.
216. Goranova TE, Ohue M, Shimoharu Y, Kato K. Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clin Exp Metastasis* 2011 Jun; **28**(5): 427-435.

217. Sayagues JM, Corchete LA, Gutierrez ML, Sarasquete ME, Del Mar Abad M, Bengoechea O, *et al.* Genomic characterization of liver metastases from colorectal cancer patients. *Oncotarget* 2016 Nov 08; **7**(45): 72908-72922.
218. 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. *PLoS One* 2015; **10**(5): e0126670.
219. Munoz-Bellvis L, Fontanillo C, Gonzalez-Gonzalez 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 Apr; **25**(4): 590-601.
220. Cai Z, Han S, Li Z, He L, Zhou J, Huang W, *et al.* A genome-wide assessment of variations of primary colorectal cancer maintained in metastases. *Gene* 2016 Dec 20; **595**(1): 18-24.
221. Knosel T, Petersen S, Schwabe H, Schluns K, Stein U, Schlag PM, *et al.* Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch* 2002 Feb; **440**(2): 187-194.
222. Normanno N, Rachiglio AM, Lambiase M, Martinelli E, Fenizia F, Esposito C, *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* 2015 Aug; **26**(8): 1710-1714.
223. Kosmidou V, Oikonomou E, Vlassi M, Avlonitis S, Katseli A, Tsipras I, *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 Mar; **35**(3): 329-340.
224. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, Sinha R, Zeng Z, Shia J, *et al.* Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol* 2012 Aug 20; **30**(24): 2956-2962.
225. Li ZZ, Bai L, Wang F, Zhang ZC, Zeng ZL, Zeng JB, *et al.* Comparison of KRAS mutation status between primary tumor and metastasis in Chinese colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2016 Jul; **33**(7): 71.
226. 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 Feb 01; **16**(3): 790-799.
227. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 2006 Mar; **41**(3): 185-192.
228. Yoshimoto M, Itoh F, Yamamoto H, Hinoda Y, Imai K, Yachi A. Expression of MMP-7(PUMP-1) mRNA in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 1993 Jun 19; **54**(4): 614-618.

229. Langenskiold M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005 May; **20**(3): 245-252.
230. Kryczka J, Stasiak M, Dziki L, Mik M, Dziki A, Cierniewski C. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of the beta1 integrin ectodomain facilitates colon cancer cell motility. *J Biol Chem* 2012 Oct 19; **287**(43): 36556-36566.
231. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004 Jan-Jun; **23**(1-2): 101-117.
232. Leeman MF, McKay JA, Murray GI. Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2002 Oct; **55**(10): 758-762.
233. Ganesh S, Sier CF, Heerding MM, Griffioen G, Lamers CB, Verspaget HW. Urokinase receptor and colorectal cancer survival. *Lancet* 1994 Aug 06; **344**(8919): 401-402.
234. Ebert EC. Mechanisms of colon cancer binding to substratum and cells. *Dig Dis Sci* 1996 Aug; **41**(8): 1551-1556.
235. Ohtaka K, Watanabe S, Iwazaki R, Hirose M, Sato N. Role of extracellular matrix on colonic cancer cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Mar 18; **220**(2): 346-352.
236. Kim SA, Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, Mima K, Sukawa Y, *et al.* Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 2016 Jan 19; **114**(2): 199-206.
237. Takeuchi K, Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Nakagawara G, Shiku H. Expression of CD44 variant exons 8-10 in colorectal cancer and its relationship to metastasis. *Jpn J Cancer Res* 1995 Mar; **86**(3): 292-297.
238. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 1989 Apr 21; **57**(2): 327-334.
239. Bianco R, Rosa R, Damiano V, Daniele G, Gelardi T, Garofalo S, *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008 Aug 15; **14**(16): 5069-5080.
240. Tortora G, Ciardiello F, Gasparini G. Combined targeting of EGFR-dependent and VEGF-dependent pathways: rationale, preclinical studies and clinical applications. *Nat Clin Pract Oncol* 2008 Sep; **5**(9): 521-530.

241. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, *et al.* Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 1996 Aug 21; **88**(16): 1146-1151.
242. Strater J, Walczak H, Pukrop T, Von Muller L, Hasel C, Kornmann M, *et al.* TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology* 2002 Mar; **122**(3): 659-666.
243. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 2003 Jul 01; **63**(13): 3833-3839.
244. Paschos KA, Majeed AW, Bird NC. Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer--pathobiological pathways with clinical significance. *World J Gastroenterol* 2014 Apr 14; **20**(14): 3719-3737.
245. Sun XF, Zhang H. Clinicopathological significance of stromal variables: angiogenesis, lymphangiogenesis, inflammatory infiltration, MMP and PINCH in colorectal carcinomas. *Mol Cancer* 2006 Oct 06; **5**: 43.
246. Weidle UH, Birzele F, Kruger A. Molecular targets and pathways involved in liver metastasis of colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 2015 Aug; **32**(6): 623-635.
247. Rmali KA, Puntis MC, Jiang WG. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007 Jan; **9**(1): 3-14.
248. Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* 2008 Dec; **1**(1): 69-83.
249. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002 Aug; **2**(8): 563-572.
250. Sun DC, Shi Y, Wang YR, Lv Y, Yan H, Mao H, *et al.* KRAS mutation and primary tumor location do not affect efficacy of bevacizumab-containing chemotherapy in stage IV colorectal cancer patients. *Sci Rep* 2017 Oct 30; **7**(1): 14368.
251. Royston D, Jackson DG. Mechanisms of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma. *J Pathol* 2009 Apr; **217**(5): 608-619.
252. Nagahashi M, Ramachandran S, Rashid OM, Takabe K. Lymphangiogenesis: a new player in cancer progression. *World J Gastroenterol* 2010 Aug 28; **16**(32): 4003-4012.
253. Du B, Yang ZY, Zhong XY, Fang M, Yan YR, Qi GL, *et al.* Metastasis-associated protein 1 induces VEGF-C and facilitates lymphangiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2011 Mar 07; **17**(9): 1219-1226.

254. Meijer J, Zeelenberg IS, Sipos B, Roos E. The CXCR5 chemokine receptor is expressed by carcinoma cells and promotes growth of colon carcinoma in the liver. *Cancer Res* 2006 Oct 01; **66**(19): 9576-9582.
255. Droujinine IA, Eckert MA, Zhao W. To grab the stroma by the horns: from biology to cancer therapy with mesenchymal stem cells. *Oncotarget* 2013 May; **4**(5): 651-664.
256. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009 Apr; **9**(4): 239-252.
257. Kojima M, Ochiai A. Special cancer microenvironment in human colonic cancer: Concept of cancer microenvironment formed by peritoneal invasion (CMPI) and implication of subperitoneal fibroblast in cancer progression. *Pathol Int* 2016 Mar; **66**(3): 123-131.
258. Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, *et al.* Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008 Jun 01; **68**(11): 4331-4339.
259. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* 2010 Feb; **21**(1): 19-25.
260. Zhu Y, Yin WL, Ba YF, Tian L, Gu ZQ, Zhang MS, *et al.* Transforming growth factor-1 promotes the transcriptional activation of plasminogen activator inhibitor type 1 in carcinoma-associated fibroblasts. *Mol Med Rep* 2012 Nov; **6**(5): 1001-1005.
261. Zapatka M, Zboralski D, Radacz Y, Bockmann M, Arnold C, Schoneck A, *et al.* Basement membrane component laminin-5 is a target of the tumor suppressor Smad4. *Oncogene* 2007 Mar 01; **26**(10): 1417-1427.
262. Stenzinger A, Wittschieber D, von Winterfeld M, Goeppert B, Kamphues C, Weichert W, *et al.* High extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 expression is strongly and independently associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Hum Pathol* 2012 Sep; **43**(9): 1471-1481.
263. Mizutani K, Kawano S, Minami A, Waseda M, Ikeda W, Takai Y. Interaction of nectin-like molecule 2 with integrin alpha6beta4 and inhibition of disassembly of integrin alpha6beta4 from hemidesmosomes. *J Biol Chem* 2011 Oct 21; **286**(42): 36667-36676.
264. Pereira L, Mariadason JM, Hannan RD, Dhillon AS. Implications of epithelial-mesenchymal plasticity for heterogeneity in colorectal cancer. *Front Oncol* 2015; **5**: 13.
265. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract* 2015 Aug; **211**(8): 557-569.

266. Kroepil F, Fluegen G, Vallbohmer D, Baldus SE, Dizdar L, Raffel AM, *et al.* Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters. *BMC Cancer* 2013 Mar 22; **13**: 145.
267. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Goel A, *et al.* Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2013 Nov; **34**(11): 2548-2557.
268. Singh AB, Sharma A, Smith JJ, Krishnan M, Chen X, Eschrich S, *et al.* Claudin-1 up-regulates the repressor ZEB-1 to inhibit E-cadherin expression in colon cancer cells. *Gastroenterology* 2011 Dec; **141**(6): 2140-2153.
269. Kahlert C, Lahes S, Radhakrishnan P, Dutta S, Mogler C, Herpel E, *et al.* Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro. *Clin Cancer Res* 2011 Dec 15; **17**(24): 7654-7663.
270. Jackstadt R, Roh S, Neumann J, Jung P, Hoffmann R, Horst D, *et al.* AP4 is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer. *J Exp Med* 2013 Jul 01; **210**(7): 1331-1350.
271. Valdes-Mora F, Gomez del Pulgar T, Bandres E, Cejas P, Ramirez de Molina A, Perez-Palacios R, *et al.* TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009 Jan; **16**(1): 78-87.
272. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, *et al.* Gene expression of mesenchyme forkhead 1 (FOXC2) significantly correlates with the degree of lymph node metastasis in colorectal cancer. *Int Surg* 2011 Jul-Sep; **96**(3): 207-216.
273. Han X, Fang X, Lou X, Hua D, Ding W, Foltz G, *et al.* Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One* 2012; **7**(8): e41335.
274. Dai X, Ge J, Wang X, Qian X, Zhang C, Li X. OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion. *Oncol Rep* 2013 Jan; **29**(1): 155-160.
275. Huang XF, Han J, Hu XT, He C. Mechanisms involved in biological behavior changes associated with Angptl4 expression in colon cancer cell lines. *Oncol Rep* 2012 May; **27**(5): 1541-1547.
276. Zhang W, Wang J, Zou B, Sardet C, Li J, Lam CS, *et al.* Four and a half LIM protein 2 (FHL2) negatively regulates the transcription of E-cadherin through interaction with Snail1. *Eur J Cancer* 2011 Jan; **47**(1): 121-130.

277. Nam EH, Lee Y, Park YK, Lee JW, Kim S. ZEB2 upregulates integrin alpha5 expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis* 2012 Mar; **33**(3): 563-571.
278. Li XL, Hara T, Choi Y, Subramanian M, Francis P, Bilke S, *et al.* A p21-ZEB1 complex inhibits epithelial-mesenchymal transition through the microRNA 183-96-182 cluster. *Mol Cell Biol* 2014 Feb; **34**(3): 533-550.
279. Laferriere J, Houle F, Taher MM, Valerie K, Huot J. Transendothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPK2/p38) in the tumor cells. *J Biol Chem* 2001 Sep 07; **276**(36): 33762-33772.
280. Zhu QC, Gao RY, Wu W, Qin HL. Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14**(5): 2689-2698.
281. Yun JA, Kim SH, Hong HK, Yun SH, Kim HC, Chun HK, *et al.* Loss of E-Cadherin expression is associated with a poor prognosis in stage III colorectal cancer. *Oncology* 2014; **86**(5-6): 318-328.
282. Gurzu S, Silveanu C, Fetyko A, Butiurca V, Kovacs Z, Jung I. Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016 Aug 14; **22**(30): 6764-6775.
283. Hildenbrand R, Gandhari M, Stroebel P, Marx A, Allgayer H, Arens N. The urokinase-system--role of cell proliferation and apoptosis. *Histol Histopathol* 2008 Feb; **23**(2): 227-236.
284. Kwaan HC, McMahon B. The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res* 2009; **148**: 43-66.
285. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006 Jun; **6**(6): 449-458.
286. Rejniak KA. Investigating dynamical deformations of tumor cells in circulation: predictions from a theoretical model. *Front Oncol* 2012; **2**: 111.
287. Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Xu M, Amoh Y, *et al.* Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer Res* 2005 May 15; **65**(10): 4246-4252.
288. Vekemans K, Braet F. Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J Gastroenterol* 2005 Sep 07; **11**(33): 5095-5102.
289. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009 Apr; **9**(4): 285-293.

290. Du L, Rao G, Wang H, Li B, Tian W, Cui J, *et al.* CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res* 2013 Apr 15; **73**(8): 2682-2694.
291. Chen X, Wang Y, Xia H, Wang Q, Jiang X, Lin Z, *et al.* Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. *Mol Biol Rep* 2012 Jun; **39**(6): 6707-6714.
292. Golubnitschaja O, Sridhar KC. Liver metastatic disease: new concepts and biomarker panels to improve individual outcomes. *Clin Exp Metastasis* 2016 Dec; **33**(8): 743-755.
293. Schmidt-Hieber M, Gutierrez ML, Perez-Andres M, Paiva B, Rasillo A, Tabertero MD, *et al.* Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells. *Haematologica* 2013 Feb; **98**(2): 279-287.
294. Rasillo A, Tabertero MD, Sanchez ML, Perez de Andres M, Martin Ayuso M, Hernandez J, *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 Feb 1; **97**(3): 601-609.
295. Sayagues JM, Tabertero MD, Maillo A, Espinosa A, Rasillo A, Diaz P, *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 Diagn* 2004 Nov; **6**(4): 316-325.
296. Mao X, Young BD, Lu YJ. The application of single nucleotide polymorphism microarrays in cancer research. *Curr Genomics* 2007 Jun; **8**(4): 219-228.
297. LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* 2009 Jul; **37**(13): 4181-4193.
298. Das K, Tan P. Molecular cytogenetics: recent developments and applications in cancer. *Clin Genet* 2013 Oct; **84**(4): 315-325.
299. Serrati S, De Summa S, Pilato B, Petriella D, Lacalamita R, Tommasi S, *et al.* Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *Onco Targets Ther* 2016; **9**: 7355-7365.
300. Tops BB, Normanno N, Kurth H, Amato E, Mafficini A, Rieber N, *et al.* Development of a semi-conductor sequencing-based panel for genotyping of colon and lung cancer by the Onconetwork consortium. *BMC Cancer* 2015 Jan 31; **15**: 26.

301. Jesinghaus M, Pfarr N, Endris V, Kloor M, Volckmar AL, Brandt R, *et al.* Genotyping of colorectal cancer for cancer precision medicine: Results from the IPH Center for Molecular Pathology. *Genes Chromosomes Cancer* 2016 Jun; **55**(6): 505-521.
302. Wang SR, Malik S, Tan IB, Chan YS, Hoi Q, Ow JL, *et al.* Technical Validation of a Next-Generation Sequencing Assay for Detecting Actionable Mutations in Patients with Gastrointestinal Cancer. *J Mol Diagn* 2016 May; **18**(3): 416-424.
303. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014 Apr 26; **383**(9927): 1490-1502.
304. Chen Z, Liu Z, Li W, Qu K, Deng X, Varma MG, *et al.* Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2011 Sep; **50**(9): 689-699.
305. Grade M, Gaedcke J, Wangsa D, Varma S, Beckmann J, Liersch T, *et al.* Chromosomal copy number changes of locally advanced rectal cancers treated with preoperative chemoradiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 2009 Aug; **193**(1): 19-28.
306. Camps J, Grade M, Nguyen QT, Hormann P, Becker S, Hummon AB, *et al.* Chromosomal breakpoints in primary colon cancer cluster at sites of structural variants in the genome. *Cancer Res* 2008 Mar 1; **68**(5): 1284-1295.
307. Derks S, Postma C, Carvalho B, van den Bosch SM, Moerkerk PT, Herman JG, *et al.* Integrated analysis of chromosomal, microsatellite and epigenetic instability in colorectal cancer identifies specific associations between promoter methylation of pivotal tumour suppressor and DNA repair genes and specific chromosomal alterations. *Carcinogenesis* 2008 Feb; **29**(2): 434-439.
308. Popat S, Zhao D, Chen Z, Pan H, Shao Y, Chandler I, *et al.* Relationship between chromosome 18q status and colorectal cancer prognosis: a prospective, blinded analysis of 280 patients. *Anticancer Res* 2007 Jan-Feb; **27**(1B): 627-633.
309. Sheffer M, Bacolod MD, Zuk O, Giardina SF, Pincas H, Barany F, *et al.* Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Apr 28; **106**(17): 7131-7136.
310. Diep CB, Thorstensen L, Meling GI, Skovlund E, Rognum TO, Lothe RA. Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2003 Mar 1; **21**(5): 820-829.
311. Garcia J, Duran A, Tabernero MD, Garcia Plaza A, Flores Corral T, Najera ML, *et al.* Numerical abnormalities of chromosomes 17 and 18 in sporadic colorectal cancer: Incidence and correlation with clinical and biological findings and the prognosis of the disease. *Cytometry B Clin Cytom* 2003 Jan; **51**(1): 14-20.

312. Khine K, Smith DR, Goh HS. High frequency of allelic deletion on chromosome 17p in advanced colorectal cancer. *Cancer* 1994 Jan 1; **73**(1): 28-35.
313. Losi L, Luppi G, Benhattar J. Assessment of K-ras, Smad4 and p53 gene alterations in colorectal metastases and their role in the metastatic process. *Oncol Rep* 2004 Dec; **12**(6): 1221-1225.
314. Iino H, Fukayama M, Maeda Y, Koike M, Mori T, Takahashi T, *et al.* Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. 17p, 18q, and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* 1994 Mar 1; **73**(5): 1324-1331.
315. Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Rustgi AK. Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999 Oct; **117**(4): 831-837.
316. Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK. A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res* 2000 Jun 1; **60**(11): 2836-2839.
317. Yana I, Kurahashi H, Nakamori S, Kameyama M, Nakamura T, Takami M, *et al.* Frequent loss of heterozygosity at telomeric loci on 22q in sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer* 1995 Jan 17; **60**(2): 174-177.
318. Al-Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD. Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 1999 Apr; **24**(4): 306-314.
319. Ghadimi BM, Grade M, Monkemeyer C, Kulle B, Gaedcke J, Gunawan B, *et al.* Distinct chromosomal profiles in metastasizing and non-metastasizing colorectal carcinomas. *Cell Oncol* 2006; **28**(5-6): 273-281.
320. Pouligiannis G, Ichimura K, Hamoudi RA, Luo F, Leung SY, Yuen ST, *et al.* Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. *J Pathol* 2010 Feb; **220**(3): 338-347.
321. Jia M, Souchelnytskyi N, Hellman U, O'Hare M, Jat PS, Souchelnytskyi S. Proteome profiling of immortalization-to-senescence transition of human breast epithelial cells identified MAP2K3 as a senescence-promoting protein which is downregulated in human breast cancer. *Proteomics Clin Appl* 2010 Nov; **4**(10-11): 816-828.
322. Gurtner A, Starace G, Norelli G, Piaggio G, Sacchi A, Bossi G. Mutant p53-induced up-regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 contributes to gain of function. *J Biol Chem* 2010 May 7; **285**(19): 14160-14169.
323. Sher RB, Cox GA, Mills KD, Sundberg JP. Rhabdomyosarcomas in aging A/J mice. *PLoS One* 2011; **6**(8): e23498.

324. Kim DH, Lee ST, Won HH, Kim S, Kim MJ, Kim HJ, *et al.* A genome-wide association study identifies novel loci associated with susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011 Jun 23; **117**(25): 6906-6911.
325. Liu YL, Yang YM, Xu H, Dong XS. Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2011 Mar 1; **103**(3): 283-289.
326. Liu YL, Yang YM, Xu H, Dong XS. Increased expression of ubiquitin-specific protease 22 can promote cancer progression and predict therapy failure in human colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2010 Nov; **25**(11): 1800-1805.
327. Li Y, Yang Y, Li J, Liu H, Chen F, Li B, *et al.* USP22 drives colorectal cancer invasion and metastasis via epithelial-mesenchymal transition by activating AP4. *Oncotarget* 2017 May 16; **8**(20): 32683-32695.
328. Diep CB, Parada LA, Teixeira MR, Eknaes M, Nesland JM, Johansson B, *et al.* Genetic profiling of colorectal cancer liver metastases by combined comparative genomic hybridization and G-banding analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2003 Feb; **36**(2): 189-197.
329. Payne CM, Crowley-Skillicorn C, Bernstein C, Holubec H, Bernstein H. Molecular and cellular pathways associated with chromosome 1p deletions during colon carcinogenesis. *Clin Exp Gastroenterol* 2011; **4**: 75-119.
330. Tanaka T, Watanabe T, Kitayama J, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, *et al.* Chromosome 18q deletion as a novel molecular predictor for colorectal cancer with simultaneous hepatic metastasis. *Diagn Mol Pathol* 2009 Dec; **18**(4): 219-225.
331. Stawski R, Piaskowski S, Stoczynska-Fidelus E, Wozniak K, Bienkowski M, Zakrzewska M, *et al.* Reduced expression of ELAVL4 in male meningioma patients. *Brain Tumor Pathol* 2013 Jul; **30**(3): 160-166.
332. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, *et al.* Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2012 Jun 20; **30**(18): 2256-2264.
333. Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capella G, Egozcue J, *et al.* Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer* 2004 Jul 20; **110**(6): 869-874.
334. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998 Oct 22; **395**(6704): 801-804.
335. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2004 Aug 15; **22**(16): 3420-3428.

336. Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Sato T, Ikemoto K, Ikeda E, *et al.* Chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2007 Jan; **17**(1): 261-267.
337. Soltany-Rezaee-Rad M, Mottaghi-Dastjerdi N, Setayesh N, Roshandel G, Ebrahimifard F, Sepehrizadeh Z. Overexpression of FOXO3, MYD88, and GAPDH Identified by Suppression Subtractive Hybridization in Esophageal Cancer Is Associated with Autophagy. *Gastroenterol Res Pract* 2014; **2014**: 185035.
338. Liu X, Ge X, Zhang Z, Zhang X, Chang J, Wu Z, *et al.* MicroRNA-940 promotes tumor cell invasion and metastasis by downregulating ZNF24 in gastric cancer. *Oncotarget* 2015 Sep 22; **6**(28): 25418-25428.
339. Jia D, Huang L, Bischoff J, Moses MA. The endogenous zinc finger transcription factor, ZNF24, modulates the angiogenic potential of human microvascular endothelial cells. *FASEB J* 2015 Apr; **29**(4): 1371-1382.
340. Harper J, Yan L, Loureiro RM, Wu I, Fang J, D'Amore PA, *et al.* Repression of vascular endothelial growth factor expression by the zinc finger transcription factor ZNF24. *Cancer Res* 2007 Sep 15; **67**(18): 8736-8741.
341. Abiatari I, Gillen S, DeOliveira T, Klose T, Bo K, Giese NA, *et al.* The microtubule-associated protein MAPRE2 is involved in perineural invasion of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2009 Nov; **35**(5): 1111-1116.
342. Knosel T, Schluns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, *et al.* Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients. *Histopathology* 2003 Oct; **43**(4): 323-331.
343. Storojeva I, Boulay JL, Ballabeni P, Buess M, Terracciano L, Laffer U, *et al.* Prognostic and predictive relevance of DNAM-1, SOCS6 and CADH-7 genes on chromosome 18q in colorectal cancer. *Oncology* 2005; **68**(2-3): 246-255.
344. Flora M, Piana S, Bassano C, Bisagni A, De Marco L, Ciarrocchi A, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number in colorectal adenoma-carcinoma progression. *Cancer Genet* 2012 Dec; **205**(12): 630-635.
345. Lu Y, Jingyan G, Baorong S, Peng J, Xu Y, Cai S. Expression of EGFR, Her2 predict lymph node metastasis (LNM)-associated metastasis in colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2012; **11**(5): 219-226.
346. Crespo I, Tao H, Nieto AB, Rebelo O, Domingues P, Vital AL, *et al.* Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels. *PLoS One* 2012; **7**(9): e46088.

347. Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MB, Milanezi F, Carvalho S, Savage K, *et al.* EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *J Pathol* 2006 Aug; **209**(4): 445-453.
348. Kumarakulasingham M, Rooney PH, Dundas SR, Telfer C, Melvin WT, Curran S, *et al.* Cytochrome p450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clin Cancer Res* 2005 May 15; **11**(10): 3758-3765.
349. Mitsiades N, Sung CC, Schultz N, Danila DC, He B, Eedunuri VK, *et al.* Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors. *Cancer Res* 2012 Dec 1; **72**(23): 6142-6152.
350. Meng X, Ezzati P, Wilkins JA. Requirement of podocalyxin in TGF-beta induced epithelial mesenchymal transition. *PLoS One* 2011 Apr 12; **6**(4): e18715.
351. Sayagues JM, Fontanillo C, Abad Mdel M, Gonzalez-Gonzalez M, Sarasquete ME, Chillon Mdel C, *et al.* Mapping of genetic abnormalities of primary tumours from metastatic CRC by high-resolution SNP arrays. *PLoS One* 2010; **5**(10): e13752.
352. Janjan NA, Abbruzzese J, Pazdur R, Khoo VS, Cleary K, Dubrow R, *et al.* Prognostic implications of response to preoperative infusional chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Radiother Oncol* 1999 May; **51**(2): 153-160.
353. Park IJ, You YN, Agarwal A, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Eng C, *et al.* Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 2012 May 20; **30**(15): 1770-1776.
354. Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol* 2012 Apr; **13**(4): e178-185.
355. Molinari C, Ballardini M, Teodorani N, Giannini M, Zoli W, Emiliani E, *et al.* Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol* 2011 Nov 18; **6**: 161.
356. Hiro J, Inoue Y, Toiyama Y, Miki C, Kusunoki M. Mechanism of resistance to chemoradiation in p53 mutant human colon cancer. *Int J Oncol* 2008 Jun; **32**(6): 1305-1310.
357. Subbarayan PR, Sarkar M, Nelson G, Benitez E, Singhal S, Ardalan B. Chronic exposure of colorectal cancer cells in culture to fluoropyrimidine analogs induces thymidylate synthase and suppresses p53. A molecular explanation for the mechanism of 5-FU resistance. *Anticancer Res* 2010 Apr; **30**(4): 1149-1156.

358. Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, *et al.* p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol* 2000 Apr; **18**(7): 1465-1473.
359. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2013 Sep; **88**(9): 803-816.
360. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, *et al.* Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009 Sep 24; **114**(13): 2589-2597.
361. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 2001 Oct 17; **277**(1-2): 15-30.
362. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2012; **2012**: 170325.
363. Chen MB, Wu XY, Yu R, Li C, Wang LQ, Shen W, *et al.* P53 status as a predictive biomarker for patients receiving neoadjuvant radiation-based treatment: a meta-analysis in rectal cancer. *PLoS One* 2012; **7**(9): e45388.
364. Petty RD, Samuel LM, Murray GI, MacDonald G, O'Kelly T, Loudon M, *et al.* APRIL is a novel clinical chemo-resistance biomarker in colorectal adenocarcinoma identified by gene expression profiling. *BMC Cancer* 2009 Dec 11; **9**: 434.
365. Dittmann LM, Danner A, Gronych J, Wolter M, Stuhler K, Grzendowski M, *et al.* Downregulation of PRDX1 by promoter hypermethylation is frequent in 1p/19q-deleted oligodendroglial tumours and increases radio- and chemosensitivity of Hs683 glioma cells in vitro. *Oncogene* 2012 Jul 19; **31**(29): 3409-3418.
366. Thiessen B, Maguire JA, McNeil K, Huntsman D, Martin MA, Horsman D. Loss of heterozygosity for loci on chromosome arms 1p and 10q in oligodendroglial tumors: relationship to outcome and chemosensitivity. *J Neurooncol* 2003 Sep; **64**(3): 271-278.
367. Takahashi S, Hirose Y, Ikeda E, Fukaya R, Kawase T. Chromosome arm 1q gain associated with good response to chemotherapy in a malignant glioma. Case report. *J Neurosurg* 2007 Mar; **106**(3): 488-494.
368. Sos ML, Michel K, Zander T, Weiss J, Frommolt P, Peifer M, *et al.* Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 2009 Jun; **119**(6): 1727-1740.

369. Cooke SL, Ng CK, Melnyk N, Garcia MJ, Hardcastle T, Temple J, *et al.* Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncogene* 2010 Sep 2; **29**(35): 4905-4913.
370. Cooke SL, Temple J, Macarthur S, Zahra MA, Tan LT, Crawford RA, *et al.* Intra-tumour genetic heterogeneity and poor chemoradiotherapy response in cervical cancer. *Br J Cancer* 2011 Jan 18; **104**(2): 361-368.
371. Espinosa AB, Taberero MD, Maillo A, Sayagues JM, Ciudad J, Merino M, *et al.* The cytogenetic relationship between primary and recurrent meningiomas points to the need for new treatment strategies in cases at high risk of relapse. *Clin Cancer Res* 2006 Feb 1; **12**(3 Pt 1): 772-780.
372. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, *et al.* Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012 Aug 2; **120**(5): 1067-1076.
373. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012 Mar 8; **366**(10): 883-892.
374. Hu XT, Chen W, Wang D, Shi QL, Zhang FB, Liao YQ, *et al.* The proteasome subunit PSMA7 located on the 20q13 amplicon is overexpressed and associated with liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2008 Feb; **19**(2): 441-446.

“Siempre acabamos llegando a donde nos esperan.”

José Saramago