

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA



ACTIVACIÓN DE SRC QUINASA: IMPLICACIONES PREDICTIVAS Y PRONÓSTICAS EN PACIENTES CON CÁNCER DE COLON

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Julia Martínez Pérez

Directora:

Rocío García Carbonero

Sevilla 2018

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas que me han acompañado y han hecho que este camino fuese más fácil. A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Rocío García Carbonero, directora de esta tesis, por su confianza infinita. Por creer en mí más que nadie, por su vocación médico-científica, inagotable capacidad de trabajo y dedicación que me demuestran que con constancia y organización todo es posible, por buscar las soluciones a mis problemas tanto dentro como fuera del hospital y por ser mi madre madrileña. Confío en que sigamos estando próximas en la distancia y este sea uno más de los muchos retos que nos quedan por compartir.

Al Dr. Paz-Ares, jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Virgen del Rocío durante la parte de mi residencia en la que inicié la tesis y jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital 12 de Octubre donde he tenido el placer de ejercer como adjunta, por su magnífico ejemplo profesional y liderazgo que suponen un gran estímulo para los que hemos podido trabajar a su lado.

Al Dr. Salvador, jefe actual del Servicio de Oncología Médica del Hospital Virgen del Rocío, por permitirme volver a mi casa “profesional” y “personal” y por su apoyo en dicha andadura. Además quiero agradecer a todos los miembros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Virgen del Rocío por su colaboración en el tratamiento y seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio, y por enseñarme a ser mejor oncóloga cada día.

Al Dr. Carnero, por guiarme en los primeros pasos del laboratorio y permitirme ser partícipe del apasionante mundo de Src, y al Dr. Iker López Calderero por su importante labor en la identificación de casos y elaboración de la base de datos clínica de parte de la cohorte incluida en este trabajo.

A todos los miembros del Laboratorio de Oncología Traslacional y Nuevas Terapias del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) y del Instituto de Investigación i+12 del Hospital 12 de Octubre de Madrid, en especial a Carmen Sáez, Beatriz Soldevilla, Beatriz Gil y Daniel Rueda, por su inestimable contribución a este proyecto.

A los responsables del Biobanco del H. Virgen del Rocío de Sevilla por su colaboración en la recopilación de muestras tumorales, y muy en especial a Carolina Castilla por su enorme dedicación y disponibilidad, su gran generosidad y su

excelente gestión del banco de tumores, herramienta indispensable para los que investigamos con muestras humanas.

A todos los pacientes oncológicos y sus familias por enseñarme a diario una lección de vida. Por vosotros merece la pena seguir aprendiendo y trabajando todos los días con una sonrisa.

A mi familia y amigos, pero en especial a mi madre, por ser mi apoyo incondicional y estar siempre disponible. Por escucharme y ayudarme en cada paso que doy, por inculcarme el valor de la honestidad, la responsabilidad y el trabajo bien hecho, y por animarme desde el primer minuto a conseguir este reto. Nunca podré agradecer lo suficiente todo ese amor.

A Sito, por ser mi otra mitad. Por todo ese tiempo que nos he robado y por siempre apoyarme aunque suponga estar lejos de ti. Por intentar comprender Src aunque no te gusten los hospitales y por entender lo que supone mi trabajo dentro y fuera de él. No puedo soñar con mejor compañero de viaje, que dentro de poco será para toda la vida.

A todos,
¡Gracias!

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracilo
ADN: ácido desoxirribonucleico
AJCC: American Joint Committee on Cancer
ARNm: ARN mensajero
C-terminal: carboxi-terminal
CCR: cáncer colorrectal
CCRM: cáncer colorrectal metastásico
CEA: antígeno carcinoembrionario
CIMP: fenotipo metilador de las islas CpG (del inglés “CpG island methylator phenotype”)
CNA: alteraciones del número de copias (del inglés “copy number alterations”)
CPNM: cáncer de pulmón no microcítico
CPT11: irinotecán
ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group
EE: enfermedad estable
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés “epidermal growth factor receptor”)
ESMO: Sociedad Europea de Oncología Médica (del inglés “European Society of Medical Oncology”)
FAK: quinasas de adhesión focal (del inglés “focal adhesion kinases”)
FOLFIRI: esquema de quimioterapia basado en irinotecán y 5- fluorouracilo
FOLFOX: esquema de quimioterapia basado en oxaliplatino y 5- fluorouracilo
FP: fluoropirimidinas
G: grado histológico
GPCRs: receptores acoplados a proteínas G (del inglés “G protein-coupled receptors”)
HUVR: Hospital Universitario Virgen del Rocío
IDEA: Evaluación Internacional de la Duración de la Quimioterapia adyuvante (del inglés “International Duration Evaluation of Adjuvant chemotherapy”)
IGF2: factor de crecimiento insulínico tipo 2 (del inglés “insulin growth factor 2”)
IHQ: inmunohistoquímica
IL-8: interleuquina 8
LMC: leucemia mieloide crónica
MAPK: protein-quinasas activadas por mitógenos (del inglés “ Mitogen-Activated Protein Kinases”)
MMR: sistema de reparación de desapareamientos del ADN (del inglés “mismatch repair”)
MSI: inestabilidad de microsátélites (del inglés “microsatellite instability”)

MSS: estabilidad de microsátelites (del inglés “microsatellite stability”)
ND: no determinado
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)
PDGFR: receptor del factor derivado de plaquetas (del inglés “platelet-derived growth factor receptor”)
PDX: xenoinjertos derivados del paciente (del inglés “patient-derived xenografts”)
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
pSrc: Src fosforilado
PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
QT: quimioterapia
RC: respuesta completa
RM: resonancia magnética
RP: respuesta parcial
RTKs: receptores de membrana con actividad tirosin-quinasa (del inglés “tyrosin-kinase receptors”)
SFK: familia de las Src quinasas (del inglés “ Src-family kinases”)
SG: supervivencia global
SLE: supervivencia libre de enfermedad
SLP: supervivencia libre de progresión
SLR: supervivencia libre de recaída
STAT3: factor activador de la transcripción 3 (del inglés “signal transducer and activator of transcription 3”)
TAC: tomografía axial computarizada
TGFβ: factor de crecimiento transformante β (del inglés “transforming growth factor beta”)
TMA: matrices de tejido (del inglés “ tissue microarrays”)
TRO: tasa de respuesta objetiva
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés “vascular endothelial growth factor”)
VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés “VEGF receptor”)
VS: versus
XELOX: esquema de quimioterapia que combina Oxaliplatino y Capecitabina

RESUMEN

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad neoplásica molecularmente heterogénea que comprende un espectro de tumores de una gran variabilidad en cuanto a su evolución natural y susceptibilidad a distintos fármacos antineoplásicos. La identificación de nuevos biomarcadores pronósticos y/o predictivos en este contexto puede aportar información fundamental sobre los mecanismos moleculares que determinan y regulan el comportamiento de la enfermedad, y facilitar nuevas herramientas de gran utilidad clínica para subclasificar de manera más precisa a los pacientes o descubrir nuevas dianas de tratamiento.

Src pertenece a una familia de receptores tirosina-quinasa citoplasmáticos que actúa como regulador de diversos procesos relacionados con la carcinogénesis. La activación de Src se asocia a un fenotipo tumoral más agresivo y puede mediar la resistencia a determinados agentes quimioterápicos, resistencia que puede potencialmente revertirse farmacológicamente con inhibidores específicos de Src.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la expresión de pSrc (Src activado) en pacientes con CCR y evaluar su papel como factor pronóstico de la evolución natural de la enfermedad y como factor predictivo de resistencia al tratamiento con quimioterapia. Con este fin se ha estudiado la expresión tumoral de pSrc en dos cohortes de pacientes: una primera cohorte de 487 pacientes con CCR estadio II-III resecado, seguido o no de quimioterapia (QT) adyuvante, y una segunda cohorte de 154 pacientes con CCR metastásico tratados en primera línea con QT basada en dobles de fluoropirimidinas (FP) con oxaliplatino o irinotecán (CPT11). La evaluación de pSrc se realizó mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) en matrices de tejido tumoral estableciéndose 4 categorías según el nivel de expresión de pSrc: 0 (ausencia de expresión), +1 (expresión leve), +2 (expresión moderada) y +3 (alta expresión).

En pacientes con CCR estadio II-III se observó que la alta expresión de pSrc (+3) se asociaba de forma significativa con un peor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 años (39.2% en pacientes con expresión de pSrc alta (+3) versus (vs) 63.3% en pacientes con expresión de pSrc baja (0-2), $HR=0.56$; $p=0.005$) y supervivencia global (SG) a 5 años (57.5% vs 74.2% en pacientes con expresión de pSrc alta (+3) vs baja (0-2), respectivamente, $HR=0.55$; $p=0.02$). Además, el análisis multivariante confirmó la sobreexpresión de pSrc como factor de mal pronóstico en CCR localizado independientemente de otros factores clínico-patológicos de conocida relevancia pronóstica para este tumor. No obstante, no se observó una clara asociación entre la expresión de pSrc y la resistencia a

quimioterapia, ya que la expresión de pSrc tuvo impacto negativo en la supervivencia independientemente del tratamiento adyuvante recibido. En la cohorte de pacientes con CCR avanzado también se observó una peor evolución clínica en tumores con expresión de pSrc (1-3) en comparación con tumores con ausencia de expresión (0), tanto en términos de supervivencia libre de progresión (SLP) (tasa de SLP a 12 meses de 65.3% vs 73.8%, respectivamente, $p=0.76$), como de SG (tasa de SG a 3 años de 51.6% vs 60.9%, respectivamente, $p=0.93$), si bien las diferencias observadas no alcanzaron la significación estadística. Igualmente, se observó cierta tendencia a una peor respuesta a la QT en tumores pSrc positivo comparado con aquellos con expresión de pSrc ausente (tasa de respuesta objetiva (TRO) de 43.5% vs 49.3%, respectivamente, $p=0.52$), pero esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa.

En resumen, los resultados de nuestro estudio demuestran la relevancia de la activación de Src en la biología del CCR, particularmente en estadios localizados, lo cual es de gran importancia no solo porque contribuye a una mejor estratificación pronóstica de los pacientes para las decisiones clínicas, sino también porque Src es una enzima cuya actividad es potencialmente manipulable con inhibidores específicos de Src, siendo por lo tanto un biomarcador de gran potencial terapéutico.

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is a molecularly heterogeneous neoplastic disease that comprises a spectrum of tumors with a great variability in their natural history and susceptibility to different antineoplastic drugs. The identification of new prognostic and/or predictive biomarkers in this context can provide essential information on the molecular mechanisms that regulate the disease and provide new clinical tools to optimize prognostic stratification of patients or discover new therapeutic targets.

Src belongs to a family of cytoplasmic non-receptor tyrosine kinases that play a key role in the regulation of different cellular processes related to carcinogenesis. Src activation has been associated with a more aggressive neoplastic phenotype and correlates with resistance to certain chemotherapeutic drugs, and preclinical studies have shown that this resistance can be reversed by pharmacological inhibition with specific inhibitors of Src.

The aim of our study was to evaluate pSrc expression in a large cohort of patients with CRC and to assess its potential value as a prognostic and/or predictive biomarker in this context. With this purpose, pSrc expression was assessed in two cohorts of patients: a first cohort of 487 patients with surgically resected stage II-III colon cancer, treated or not with adjuvant chemotherapy, and a second cohort of 154 patients with metastatic CRC treated in first line with chemotherapy regimens containing fluoropyrimidines and oxaliplatin or irinotecan. pSrc expression was assessed in paraffin-embedded tumor samples by immunohistochemistry, and cases were classified by staining intensity in 4 categories: no staining (0), weak (+1), moderate (+2), and intense (+3) staining.

In the first cohort, high pSrc expression (+3) was significantly associated with decreased 5-year disease-free survival (39.2% vs 63.3% for patients with high (+3) vs low (0-2) pSrc expression, $HR= 0.56$; $P = 0.005$) and overall survival (OS) (57.5% vs 74.2%, $HR= 0.55$; $P = 0.02$). Multivariate analysis confirmed pSrc expression as a significant prognostic factor both for disease-free and overall survival, independent of other clinicopathological factors of known prognostic relevance for this tumor. However, no clear association was observed between pSrc expression and resistance to chemotherapy, as pSrc expression was shown to have a negative impact on survival regardless of the adjuvant treatment received. In the metastatic CRC cohort, positive pSrc expression (1-3) was associated with worse outcomes compared to the absence of expression (0), both in terms of progression-free survival (PFS rate at 12 months was 65.3% vs 73.8%, respectively, $p=0.76$) and of overall survival (OS rate at 3 years was 51.6% vs 60.9%, respectively, $p=0.93$). Nevertheless, these differences did not reach statistical significance. Moreover, there was also a non-significant trend

towards worse response rates to chemotherapy in positive vs negative pSrc-expression tumors (43.5% vs 49.3%, respectively, $p=0.52$).

In summary, the results of our study illustrate the relevance of Src activation in colon cancer biology, particularly in early stages of disease, and this is of great importance not only as it improves the prognostic stratification of patients to help in clinical decisions, but also because it opens new avenues for potential pharmacologic manipulation that may eventually improve patients' outcomes.

INDICE

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	11
SUMMARY	13
INDICE	17
INDICE DE TABLAS	19
INDICE DE FIGURAS	20
INTRODUCCIÓN	23
1. Epidemiología del cáncer colorrectal y relevancia como problema de salud	23
2. Bases biológicas del cáncer colorrectal.	24
2.1. Genómica y epigenómica del cáncer colorrectal	24
2.2. Perfiles transcripcionales y clasificación molecular de consenso.....	27
2.3. Proteogenómica del cáncer colorrectal	29
3. Presentación clínica y diagnóstico del cáncer colorrectal.....	30
3.1. Presentación clínica	30
3.2. Diagnóstico y estadificación	31
4. Tratamiento del cáncer colorrectal localizado.	33
4.1. Indicación de tratamiento adyuvante	33
4.2. Factores pronósticos y predictivos.....	35
5. Tratamiento del cáncer colorrectal metastásico.	39
6. Proteína Src.	43
6.1. Estructura, regulación y función	43
6.2. Activación de Src en cáncer: implicaciones predictivas y pronósticas.....	45
6.3. Papel de Src en cáncer colorrectal	46
HIPÓTESIS.....	51
OBJETIVOS	54
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Diseño del estudio.....	57
2. Población de estudio y criterios de inclusión.....	57
3. Recogida de información clínica y consideraciones éticas.....	58
4. Gestión de las muestras tumorales.....	59
5. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de pSrc.....	59
6. Extracción de ADN.....	60
7. Análisis de inestabilidad de microsatélites.	61
8. Determinación del perfil mutacional RAS/BRAF.	62
9. Análisis estadístico.....	62
RESULTADOS.....	66
1. Cohorte 1: Pacientes con cáncer colorrectal estadio II-III.....	66
1.1. Características clínicas de los pacientes	66
1.2. Características histopatológicas y moleculares de los tumores	68
1.3. Asociación entre la expresión de pSrc y las características clinicopatológicas	70
1.4. Supervivencia en función de las características clinicopatológicas.....	72
1.5. Impacto de la expresión de pSrc en la supervivencia	74

1.6. Expresión de pSrc y sensibilidad a quimioterapia	87
CONCLUSIONES	91
ANEXO: PUBLICACIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	97

INDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Clasificación molecular de consenso del CCR.
- **Tabla 2.** Estadificación del cáncer colorrectal TNM,AJCC/UICC, 8ª edición (2017).
- **Tabla 3.** Representación esquemática de las estrategias de tratamiento en CCRm basada en la última guía de ESMO 2016.
- **Tabla 4.** Representación esquemática de las estrategias de tratamiento en CCRm en primera línea teniendo en cuenta localización tumoral.
- **Tabla 5.** Ensayos de citotoxicidad con oxaliplatino y PP2 (inhibidor de Src) en líneas celulares de CCR.
- **Tabla 6.** Características clínicas de la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Tabla 7.** Características histopatológicas y moleculares de la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Tabla 8.** Características clínico-patológicas en función de la expresión tumoral de pSrc de la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Tabla 9.** Supervivencia libre de progresión y supervivencia global en función de las características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Tabla 10.** Análisis de supervivencia en función de la expresión tumoral de pSrc en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Tabla 11.** Análisis multivariante de factores pronósticos de SLE y SG en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

INDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Vías moleculares implicadas en la carcinogénesis del CCR.
- **Figura 2.** Clasificación molecular de consenso del CCR.
- **Figura 3.** Representación esquemática de la estructura de Src.
- **Figura 4.** Valores IC50 para oxaliplatino en líneas celulares de CCR.
- **Figura 5.** Fotos ilustrativas de la expresión tumoral de pSrc valorada por IHQ.
- **Figura 6.** Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión tumoral de pSrc agrupada (0-2 vs 3) en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Figura 7.** Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión tumoral de pSrc en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Figura 8.** Supervivencia global en función de la expresión tumoral de pSrc agrupada (0-2 vs 3) en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Figura 9.** Supervivencia global en función de la expresión tumoral de pSrc en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.
- **Figura 10.** Impacto de la expresión de pSrc en la supervivencia libre de enfermedad en el subgrupo de pacientes con CCR estadio II.
- **Figura 11.** Impacto de la expresión de pSrc en la supervivencia global en el subgrupo de pacientes con CCR estadio II.
- **Figura 12.** Impacto de la expresión de pSrc en la supervivencia libre de enfermedad en función de la QT recibida.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del cáncer colorrectal y relevancia como problema de salud.

El CCR constituye la tercera enfermedad neoplásica más frecuente a nivel mundial, con una incidencia global de 1,36 millones de casos nuevos diagnosticados en el año 2012 (*Ferlay et al, 2012*) y más de 135.000 casos nuevos estimados sólo en Estados Unidos en 2017 (*Siegel et al, 2017*). En cuanto a la distribución por sexos, el CCR es el segundo tumor más frecuente en las mujeres, por detrás del cáncer de mama, diagnosticándose 614.000 nuevos casos cada año, lo que supone un 9.2% del total de los cánceres diagnosticados mundialmente. En los hombres se diagnostican 746.000 casos nuevos anuales, representado la tercera neoplasia en frecuencia en los varones (10%), después del cáncer de pulmón y el de próstata.

El CCR es la cuarta causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos a nivel mundial, siendo responsable de 694.000 muertes anuales, lo que supone el 8.5 % del total de muertes por cáncer. Distinguiendo entre sexos, el 9% de las muertes por cáncer en las mujeres y el 8% en los varones se deben al cáncer de colon, suponiendo la tercera y cuarta enfermedad neoplásica más letal, respectivamente (*Ferlay et al, 2012*).

Existe además una importante variabilidad geográfica, siendo su incidencia mayor en países desarrollados. No obstante, se ha observado una estabilización de la tasa de mortalidad por CCR en las últimas décadas en países desarrollados como consecuencia de la implantación de programas de cribado poblacional, y la optimización del diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

En España, el CCR es el tumor de mayor incidencia cuando se consideran ambos géneros de manera conjunta, con 32.240 nuevos casos diagnosticados en el año 2012, que comprenden el 15% del total de los tumores. Representa además la segunda causa de muerte por cáncer, con 14.700 defunciones anuales en 2012 (*Ferlay et al, 2012*).

2. Bases biológicas del cáncer colorrectal.

2.1. Genómica y epigenómica del cáncer colorrectal

El CCR fue uno de los primeros tumores sólidos caracterizados molecularmente. En el modelo clásico de carcinogénesis colorrectal, descrito por primera vez por Vogelstein en 1990 (*Fearon and Vogelstein, 1990*), el epitelio colónico normal se va progresivamente transformando a epitelio displásico, adenoma temprano, adenoma tardío y carcinoma invasor a través de la adquisición secuencial de una serie de alteraciones genéticas (pérdida de genes supresores de tumores, activación de oncogenes) en un proceso más o menos predecible que puede durar muchos años. En este modelo clásico el CCR se origina en un pólipo adenomatoso, y el adenoma tubular sería la lesión precursora. Este modelo permitió identificar los principales genes supresores de tumores (APC, p53, SMAD4,..) y oncogenes (RAS, BRAF, PIK3CA,..) implicados en el desarrollo del CCR. La acumulación de mutaciones en estos genes confiere una ventaja selectiva que da lugar a la iniciación y progresión del CCR a través de la desregulación de vías que modulan la diferenciación y proliferación celular, y la apoptosis. Aunque el orden en el que suceden estas mutaciones no es invariable, presentan una asociación importante con determinadas etapas de la tumorigénesis (p.ej. la inactivación de APC está implicada en la iniciación tumoral, la activación de RAS es también un evento temprano en la transformación maligna, mientras que la pérdida de 18q o la inactivación de p53 sucede en fases avanzadas de la progresión tumoral).

Posteriormente se describieron 2 vías alternativas de desarrollo del CCR que se caracterizaban por distintas manifestaciones clínicas, patológicas y moleculares (*Colussi et al, 2013*), la *vía supresora* y la *vía mutadora*. La vía supresora o vía de inestabilidad cromosómica o CIN (del inglés “Chromosomal instability”), es responsable del 85% de los CCR esporádicos y se caracteriza por alteraciones del cariotipo con pérdidas, ganancias o translocaciones de regiones cromosómicas que albergan genes esenciales en el proceso de carcinogénesis del CCR; el factor presumiblemente iniciador de esta vía sería la pérdida del gen supresor de tumores APC; su lesión precursora es el pólipo adenomatoso convencional. La vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés “Microsatellite instability”), es responsable del 15% del CCR y del 95% del cáncer de colon familiar no polipósico. causada por un funcionamiento deficiente del sistema de reparación de los desapareamientos del ácido desoxirribonucleico (ADN) (MMR, del inglés “mismatch repair”) durante la replicación. Esta deficiencia puede deberse a la existencia de mutaciones inactivadoras de los genes que conforman el sistema MMR (MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 o PMS2), lo cual generalmente sucede en pacientes portadores de mutaciones germinales en estos genes (Síndrome de Lynch), o al silenciamiento

epigenético mediante hipermetilación de la región promotora del gen MLH1, que es lo que generalmente sucede en tumores esporádicos con MSI. Estos últimos suelen originarse en adenomas serrados, en mujeres de edad avanzada, presentan con frecuencia hipermetilación de otros genes (fenotipo metilador) y mutaciones en BRAF, y se asocian a ciertos rasgos fenotípicos característicos como son la localización en colon derecho, histología mucinosa o con células en anillo de sello, y la presencia de un infiltrado linfocitario peritumoral. Son fácilmente identificables por técnicas de IHQ por la pérdida de expresión de las proteínas del sistema MMR, o mediante PCR por las longitudes alteradas de secuencias cortas y repetitivas de nucleótidos (microsatélites) en el ADN tumoral. Tanto los tumores con MSI familiares como esporádicos son tumores con una alta tasa de mutaciones, y la inactivación de genes que contienen microsatélites en su secuencia codificante (p.ej. TGFβR2 o BAX) contribuye a la progresión tumoral.

Más recientemente, en 2012, se publicó el TCGA (“The Cancer Genome Atlas”) del CCR (*Cancer Genome Atlas Network, 2012*), una caracterización molecular exhaustiva e integrada en el que se analizaron 276 muestras de CCR mediante secuenciación del exoma (y del genoma completo en 97 casos), análisis del número de copias de ADN y alteraciones cromosómicas, análisis de los perfiles de metilación y análisis de la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y microARN. Los análisis de secuenciación detectaron que el 16% de los casos eran tumores hipermutados (tasa de mutaciones >12 por 10^6 pares de bases) y un 84% correspondía a tumores no hipermutados. Entre los hipermutados, un 77% presentaban inestabilidad de microsatélites por hipermetilación y silenciamiento de MLH1 y un 23% presentaban mutaciones somáticas del sistema MMR o mutaciones de la ADN polimerasa ε (POLE). Se identificaron 32 genes mutados recurrentemente en ambos grupos: 15 en tumores hipermutados (entre los que destaca TGFβR2 en el 51%, BRAF en el 46%, y MSH3 y MSH6 en el 40% de los casos, presentando mutaciones en APC sólo el 51%) y 17 en tumores no hipermutados (destacando mutaciones en APC en el 81%, TP53 en el 60% y KRAS en el 43% de los casos). Estas diferencias demuestran que los tumores hipermutados y no hipermutados progresan mediante diferentes secuencias de eventos genéticos. Evaluando el patrón de metilación, los tumores se clasificaron en 4 subgrupos: 2 de ellos con alta tasa de metilación de islas CpG (CIMP; del inglés “CpG island methylator phenotype”) que se subdividían a su vez en CIMP alto y bajo y que se presentaban de forma más frecuente en colon derecho; y otros 2 subgrupos con baja tasa de metilación que se correspondían fundamentalmente a tumores no hipermutados de diferentes localizaciones anatómicas. Según el perfil de expresión de ARNm se distinguían 3 subgrupos: 1 que correspondía a tumores con alta tasa de metilación e hipermutados, y otros dos que no se correspondían con ningún subgrupo de metilación. El análisis integrado de la información clínica y molecular mostró que los tumores hipermutados son tumores generalmente diploides que se localizan con más frecuencia en colon derecho, presentan mayores tasas de MSI, hipermetilación y mutaciones de BRAF (V600E), mientras que los tumores no hipermutados originados en distintas

2.2. Perfiles transcripcionales y clasificación molecular de consenso

El Colorrectal Cancer Subtyping Consortium, un consorcio internacional de expertos, ha establecido recientemente una nueva clasificación molecular del CCR en base a datos de expresión génica, como caracterización molecular más cercanamente vinculada, potencialmente, al fenotipo tumoral y a su comportamiento clínico. Esta clasificación de consenso unifica por primera vez varios sistemas de clasificación previamente desarrollados por distintos grupos independientes, limitados por su heterogeneidad metodológica e inconsistencia de resultados. Tras el análisis conjunto de los perfiles transcripcionales de más de 4000 muestras de CCR, se establecieron cuatro subtipos moleculares de consenso (CMS1-4) (Tabla 1; Figura 2) (Guinney *et al*, 2015; Dienstmann *et al*, 2017). Un quinto subgrupo, que supone un 13% de los pacientes, incluye aquellos no clasificables en ninguno de los grupos anteriores, pero no constituye un grupo independiente por sí mismo por su gran heterogeneidad biológica y molecular (Dienstmann *et al*, 2014; Guinney *et al*, 2015; Dienstmann *et al*, 2017).

Posteriormente se trató de caracterizar biológicamente los subgrupos moleculares identificados, en base a distintas características clínicas, genéticas y epigenéticas bien establecidas. En primer lugar se observó que la mayoría de los tumores con MSI pertenecían al subgrupo **CMS1 o inmune**, que correspondía al 14% de las muestras, e incluía tumores hipermutados, hipermetilados, con una alta prevalencia de mutaciones BRAF, y un abundante infiltrado inmune peritumoral, fundamentalmente de linfocitos T citotóxicos CD8+, T helper 1 CD4+ (T_H1) y natural killer (NK). Desde el punto de vista clínico, este subgrupo se caracterizaba por ser más frecuente en mujeres de edad más avanzada, con tumores localizados en colon derecho, alto grado de diferenciación histológica y pobre pronóstico tras la recidiva tumoral. Sin embargo, los tumores con inestabilidad cromosómica podían pertenecer a los subgrupos CMS 2, 3 y 4.

El grupo **CMS2 o canónico** fue el subtipo más común (37%) y se caracterizaban por una alta tasa de alteraciones del número de copias (CNAs) (ganancias de oncogenes, pérdidas de genes supresores) y una baja tasa de metilación. En este subgrupo destaca la implicación de la vía WNT/MYC en el proceso de carcinogénesis, con frecuentes mutaciones de APC y TP53, sobre-expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y HER2, IGF2, IRS2, HNF4A y ciclinas, así como activación de Src. Es el subtipo más frecuente en tumores localizados en el colon izquierdo.

El grupo **CMS3 o metabólico** (13% de los casos) tenía una menor tasa de CNAs, de hecho un 30% de los tumores eran MSI, hipermutados, y con niveles intermedios de metilación. Este subgrupo es el que presentaba mayor prevalencia de mutaciones de KRAS y su característica dominante era la implicación de vías moleculares que regulan el metabolismo, con activación de la glutaminólisis y la lipídogenésis.

El grupo **CMS4 o mesenquimal** (23% de los casos), se caracterizaba por alta inestabilidad cromosómica, alta tasa de CNAs e implicación de genes y proteínas asociados a angiogénesis, invasión estromal y activación mesenquimal que participan en la transición epitelio-mesénquima (como el TGF β y receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)). Clínicamente estos tumores se diagnosticaban en estadios más avanzados de la enfermedad (III-IV) presentando, respecto a los demás grupos, el peor pronóstico, con menor supervivencia libre de recaída (SLR) y una inferior SG.

Tabla 1. Clasificación molecular de consenso del CCR.

Subtipo	Frecuencia	Características clínicas	Características moleculares
CMS-1 Inmune	13%	Mujeres Edad avanzada Colon derecho El subgrupo de peor pronóstico tras la recidiva	<ul style="list-style-type: none"> • Inestabilidad microsatélites • Hipermutados • Alta metilación CpG • BRAF mutado • Activación inmune
CMS-2 Canónico	37%	Colon izquierdo Varones El subgrupo de mejor pronóstico tras la recidiva	<ul style="list-style-type: none"> • Inestabilidad cromosómica • Alta tasa de CNAs • Activación vía WNT/MYC • Activación Src
CMS-3 Metabólico	13%		<ul style="list-style-type: none"> • Variabilidad en inestabilidad cromosómica y de microsatélites • Hipermutados (30%) • Mutación de KRAS • Desregulación metabólica
CMS-4 Mesenquimal	23%	Estadio avanzado El subgrupo globalmente de peor pronóstico	<ul style="list-style-type: none"> • Inestabilidad cromosómica • Alta tasa de CNAs • Transición epitelio-mesénquima (infiltración estromal, angiogénesis, activación TGFβ)

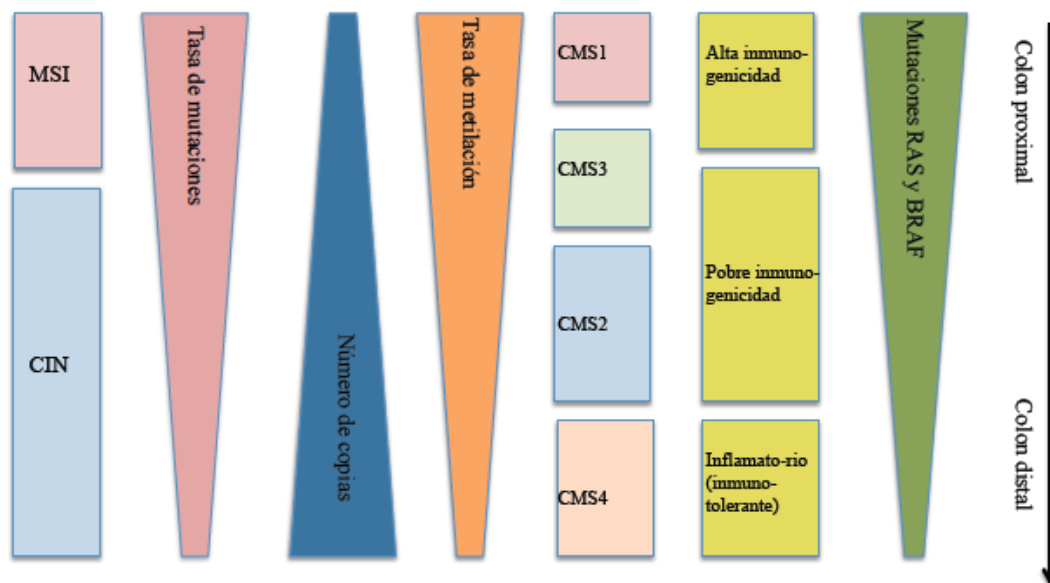


Figura 2. Clasificación molecular de consenso del CCR (adaptada de Dienstmann et al, 2017).

No obstante, y a pesar de que esta clasificación de consenso es la clasificación molecular más robusta actualmente disponible para el CCR y ha supuesto un avance importante en la caracterización molecular estandarizada del CCR, no están claras sus implicaciones predictivas en cuanto a la selección personalizada de las terapias antineoplásicas y no es una clasificación aplicable todavía en la práctica clínica habitual.

2.3. Proteogenómica del cáncer colorrectal

Utilizando 95 muestras tumorales del TCGA se llevó a cabo un análisis proteogenómico del CCR (Zhang et al, 2014). En primer lugar se observó que la expresión de ARNm era un pobre predictor de la cantidad de proteína expresada en los distintos tumores y que pocas de las alteraciones genéticas en el número de copias se traducían a nivel proteico. En base a la expresión proteica se establecieron 5 subgrupos de CCR (A-E).

La mayor parte de los tumores hipermutados asociados a MSI y los tumores con mutaciones en POLE y BRAF se incluyeron dentro de los subgrupos B y C, mientras que los otros 3 subtipos se asociaron con inestabilidad cromosómica. El subtipo B además se asoció de forma significativa con el subgrupo de alta tasa de metilación de islas CpG del TCGA y el subtipo C, por el contrario, con el subgrupo con baja tasa de metilación (cluster 4). Otro aspecto diferenciador del subtipo B fue la

ausencia de mutaciones en TP53 o pérdida del cromosoma 18q, mientras que el subtipo E se asoció de forma significativa con mutaciones en TP53 y pérdida del cromosoma 18q.

En esta subclasificación también se valoró la posible asociación con características clínicas, encontrándose únicamente que los tumores en estadio II estaban enriquecidos del subtipo C. Además de la comparación con los subgrupos del TCGA, se analizó la asociación con otras clasificaciones genómicas de CCR alternativas (*De Sousa et al, 2013; Sadanandam et al, 2013*), encontrándose una superposición entre el subgrupo C y el subgrupo “stem like” descrito por *Sadanandam et al* y el subtipo “CCS3” descrito por *De Sousa et al*, ambos subgrupos caracterizados por un mal pronóstico. Esto sugiere que el subtipo C podría también asociarse con un peor pronóstico, e ilustra como la subclasificación proteómica en los subtipos B y C podría ser relevante en los tumores con MSI, generalmente de buen pronóstico.

Por otro lado, se detectó la presencia de 5 “puntos calientes” en el contexto de las CNAs definidos como localizaciones cromosómicas cuya amplificación se asoció con cambios en la transcripción del ARNm y la expresión de proteínas. De las 5 localizaciones cabe destacar la amplificación del cromosoma 20q, que fue la que presentó una mayor asociación, ya que el 85% de los 79 genes valorables de esta región mostraba una correlación significativa CNA-ARNm, aunque sólo el 51% mostraron correlación CNA-proteína significativa. Entre dichas proteínas destacan HNF4 α , TOMM34 y Src.

3. Presentación clínica y diagnóstico del cáncer colorrectal.

3.1. Presentación clínica

El CCR se diagnostica habitualmente entre la sexta y octava década de la vida, excepto en las formas hereditarias en las que aparece unos 20 años antes. El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente (90-95%), seguido del adenocarcinoma coloidal o mucinoso (10%). Aproximadamente el 70% de los CCR se localizan en el colon, con mayor frecuencia en el izquierdo, y el 30% restante en recto o unión rectosigmoidea.

La presentación clínica del CCR varía según la extensión y la localización del tumor. Con frecuencia puede cursar de manera asintomática, en cuyo caso el diagnóstico se realiza en el contexto de programas de cribado o de forma incidental, y cuando produce síntomas suele encontrarse en una fase avanzada de la enfermedad.

Los síntomas pueden ser vagos y poco específicos (alteración del hábito intestinal, hematoquecia, dolor abdominal, astenia y anorexia), aunque también pueden debutar como una urgencia quirúrgica (perforación u obstrucción intestinal) (*Van Cutsem et al, 2016*).

3.2. Diagnóstico y estadificación

El diagnóstico del cáncer colorrectal implica la confirmación histopatológica del tumor y la evaluación de la extensión locorregional y a distancia. Ante la sospecha de cáncer de colon, una adecuada historia clínica y exploración física completa son esenciales. Analíticamente el hallazgo más frecuente es la existencia de anemia microcítica, pudiendo detectarse también una alteración del perfil hepático en el caso de enfermedad metastásica en el hígado. El marcador sérico antígeno carcinoembrionario (CEA) es útil como marcador pronóstico y para el seguimiento. La técnica diagnóstica fundamental es la colonoscopia, que permite el diagnóstico histológico y aporta datos sobre la localización de la lesión y la detección de posibles tumores o lesiones premalignas o malignas sincrónicas. Para evaluar la extensión local y valorar la existencia de enfermedad a distancia está indicada la realización de una tomografía axial computarizada (TAC) de tórax, abdomen y pelvis. En el caso del cáncer de recto, se recomienda, además, la realización de una resonancia magnética (RM) pélvica y/o una ecoendoscopia endorrectal para una valoración más precisa de la extensión locorregional de la enfermedad.

El estadiaje del cáncer colorrectal constituye el principal factor pronóstico y es fundamental para la planificación del tratamiento del paciente. Se realiza en base a las características patológicas y clínicas de la enfermedad atendiendo al grado de penetración del tumor en la pared intestinal (T), la presencia o ausencia de afectación ganglionar (N) y la presencia o ausencia de metástasis (M). Se determina de acuerdo al American Joint Cancer on Committee (AJCC) utilizando la clasificación TNM, cuya 8ª edición ha sido actualizada en 2017 (*Weiser et al, 2018*) (Tabla 2).

Tabla 2. Estadificación del cáncer colorrectal TNM,AJCC/UICC, 8ª edición (2017).

Tumor primario (T)	
Tx	Tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1	Tumor invade la submucosa
T2	Tumor invade la muscular propia
T3	Tumor invade a través de la muscular propia en los tejidos pericorreciales
T4a	Tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral
T4b	Tumor invade directamente o está adherido a otros órganos o estructuras
Ganglios linfáticos regionales (N)	
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Existen metástasis en 1- 3 ganglios linfáticos regionales
N1a	-Metástasis en un ganglio linfático regional
N1b	-Metástasis en 2 o 3 ganglios linfáticos regionales
N1c	-Depósitos de tumor satélites en la subserosa o en tejidos no peritonealizados
N2	Metástasis en ≥ 4 ganglios linfáticos regionales
N2a	-Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales
N2b	-Metástasis en ≥ 7 ganglios linfáticos regionales
Metástasis a distancia (M)	
M0	No existen metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	-Metástasis confinadas en un órgano
M1b	-Metástasis en más de un órgano
M1c	-Metástasis en el peritoneo con o sin metástasis en otras localizaciones

Estadío	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c

4. Tratamiento del cáncer colorrectal localizado.

Aproximadamente dos tercios de los pacientes se diagnostican en estadios precoces de la enfermedad (estadio I-III), potencialmente curables mediante resección quirúrgica, que constituye el tratamiento fundamental, seguido o no de QT adyuvante en función del riesgo de recaída. Globalmente se ha demostrado que los pacientes con estadio III y algunos subgrupos de pacientes con estadio II de CCR se benefician de un tratamiento adyuvante tras la cirugía.

4.1. Indicación de tratamiento adyuvante

La QT adyuvante basada en 5-fluorouracilo (5-FU) en pacientes con CCR estadio III se estableció en los años '90 como estándar de tratamiento tras demostrarse un beneficio en supervivencia en comparación con cirugía sola (*Moertel et al, 1990; Haller et al, 2005*). Un meta-análisis de 18 ensayos clínicos randomizados que incluyeron 20.800 pacientes con cáncer de colon estadio II-III, que fueron aleatorizados a recibir quimioterapia adyuvante basada en 5-FU frente a observación tras la cirugía, demostró un beneficio absoluto en SG del 5% para pacientes con estadio II y de un 10% para pacientes en estadio III (*Sargent et al, 2009*). Posteriormente, tres estudios randomizados (*Andre et al, 2004; Kuebler et al, 2007; Haller et al, 2011*) demostraron que añadir oxaliplatino a distintos esquemas de fluoropirimidinas aumentaba significativamente la SLE y la SG de los pacientes con cáncer de colon estadio III, constituyéndose por ello esta combinación en el esquema estándar de tratamiento adyuvante en estos pacientes (esquema FOLFOX o XELOX). No obstante, el tratamiento adyuvante con FP en monoterapia sigue considerándose

adecuado en pacientes frágiles y/o ancianos (>70 años), en los que se ha constatado que existe beneficio en supervivencia con la QT adyuvante (*Sanoff et al, 2012*), pero en los que existen dudas del beneficio aportado con el oxaliplatino (*Tournigand et al, 2012; Haller et al, 2015*). El tratamiento adyuvante con capecitabina en monoterapia es al menos igual de eficaz que el 5-FU intravenoso administrado en infusión rápida, y se asocia a menor toxicidad digestiva y hematológica, pero a mayor incidencia de síndrome de mano-pie y de hiperbilirrubinemia (*Twelves et al, 2005*).

El beneficio de la QT adyuvante en los pacientes con estadio II es un aspecto particularmente controvertido. Estos pacientes pueden ser observados tras la cirugía o tratados con QT adyuvante dependiendo de factores de riesgo que abarcan características clínicas y biomoleculares del tumor. En cualquier caso, se estima que el beneficio global de la QT en este contexto supone un incremento absoluto del 5% en supervivencia (*Sargent et al, 2009*). Dada la pequeña magnitud del beneficio que la QT aporta en pacientes con CCR estadio II, y teniendo en cuenta que no es un tratamiento exento de riesgos, la indicación de QT adyuvante en estos pacientes debe individualizarse y generalmente se emplea en los subgrupos de alto riesgo de recurrencia (*Dienstmann et al, 2015*).

Respecto a la duración del tratamiento adyuvante, el ensayo INT 0089 (*Haller et al, 2005*) estableció el estándar de administrar 6 meses de tratamiento adyuvante con fluoropirimidinas, en lugar de los 12 meses del esquema original de Moertel. En 2005, se llevó a cabo un estudio que comparaba 3 meses de 5-FU en infusión continua vs 6 meses del esquema estándar de 5-FU en infusión rápida de la clínica Mayo, observándose resultados similares en eficacia y menor toxicidad para el tratamiento con 5-FU en infusión continua, aunque el estudio había sido diseñado para demostrar superioridad (*Chau et al, 2005*). Más recientemente, basándose en el doblete de QT estándar (oxaliplatino + FP), se han comunicado los resultados de un grupo de estudios randomizados que han comparado 3 vs 6 meses de tratamiento adyuvante en pacientes intervenidos de CCR estadio III dentro del proyecto IDEA (del inglés “International Duration Evaluation of Adjuvant chemotherapy”). Este proyecto incluye 6 estudios randomizados (SCOT, TOSCA, SWOG80702, IDEA France, ACHIEVE, HORG) con un total de 12834 pacientes (*Grothey et al, 2018*). El objetivo principal fue la tasa de SLE a 3 años. Los estudios analizados de forma individual difieren en sus resultados y el primer análisis conjunto de todos ellos no alcanzó la significación estadística para demostrar la no inferioridad de 3 vs 6 meses de tratamiento en la población global del estudio (HR 1.07; IC 95% 1.00-1.15). Sin embargo, en el análisis preplanificado por esquemas de quimioterapia sí se demostró la no inferioridad del tratamiento con 3 vs 6 meses de XELOX (HR 0.95; IC 95% 0.85-1.06), pero no la de 3 vs 6 meses de FOLFOX (HR 1.16; IC 95% 1.06-1.26). En análisis exploratorios en función del estadiaje tumoral también se observó la no inferioridad de 3 vs 6 meses de quimioterapia en pacientes con tumores T1-3 N1 (HR 1.01; IC 95% 0.90-1.12) pero, por el contrario, el tratamiento con 6 meses de quimioterapia fue superior a 3 meses de tratamiento en pacientes con tumores T4 o

N2 (SLE a 3 años: 64.4% vs 62.7%, HR 1.12; IC 95% 1.03-1.23, P=0.01). Estos datos sugieren que en pacientes de menor riesgo (T1-3 N1) podría estar justificado un tratamiento de 3 meses, particularmente si se va a emplear XELOX, lo cual reduciría de manera significativa la neurotoxicidad inducida por el oxaliplatino, además de ser menos costoso para el paciente y para el sistema de salud. No obstante, hay que ser cautos a la hora de interpretar y aplicar estos datos preliminares, teniendo en cuenta que no existe randomización entre los esquemas de tratamiento, que no todos los estudios habían alcanzado los criterios de reclutamiento establecido y que el seguimiento es aún insuficiente para tener datos concluyentes en términos de SG.

4.2. Factores pronósticos y predictivos

4.2.1. Factores clínico-patológicos

En la práctica clínica habitual los factores clínico-patológicos son los más frecuentemente empleados para la estratificación pronóstica de la enfermedad, en función de la cual se establece la estrategia terapéutica. En el contexto del cáncer colorrectal localizado la estadificación TNM juega un papel fundamental en este sentido. Así, los pacientes con estadio I o II de bajo riesgo se tratan únicamente con cirugía, mientras que los estadio II de alto riesgo y los estadio III tienen indicación de recibir quimioterapia adyuvante. Se definen como estadio II de alto riesgo aquellos pacientes que presentan alguno de los siguientes criterios: presentación clínica de urgencia en forma de oclusión o perforación intestinal, invasión de órganos vecinos (pT4), escaso número de ganglios analizados en la pieza quirúrgica (<12), presencia de invasión linfovascular y perineural, y pobre diferenciación histológica (grado histológico (G) 3) (*Benson et al, 2004*). No obstante, no todos los factores tienen el mismo peso, siendo el indicador histopatológico de mal pronóstico más robusto el estadiaje T4 (*Roth et al, 2012; Snaebjornsson et al, 2014*). Estudios retrospectivos identificaron también la invasión perineural y linfovascular como marcador de riesgo (*Liebig et al, 2009*), mientras que el grado histológico no se ha asociado de forma consistente con un incremento del riesgo de recurrencia en estadio II (*Gray et al, 2011*). De hecho, la pobre diferenciación tumoral se ha correlacionado con la presencia de MSI, sin tener impacto negativo establecido en estos pacientes, por lo que la agresividad de la pobre diferenciación histológica debería restringirse a los tumores con estabilidad de microsatélites (MSS). Respecto al número de ganglios analizados, una escasa extirpación ganglionar aumenta las posibilidades de infraestadificación y denota una cirugía o examen histopatológico subóptimos, todo lo cual se asocia a un peor pronóstico. Aunque no existe un número absoluto de ganglios analizados que defina un adecuado o inadecuado mapeo ganglionar, la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) y las guías americanas recomiendan el

estudio de al menos 12 ganglios para una adecuada estadificación.

Otro factor clínico muy relevante es la localización del tumor primario (colon derecho vs izquierdo). Los resultados de recientes meta-análisis que incluyen múltiples estudios y un gran número de pacientes (Petrelli et al, 2016; Holch et al, 2017;) confirman que los tumores de colon derecho se asocian de manera significativa con una menor supervivencia, independientemente del estadio o del tratamiento adyuvante recibido en estadios localizados. Se han postulado múltiples factores que pueden justificar este diferente comportamiento clínico, incluidas diferencias embriológicas, ambientales (diferente microbiota y composición de contenido fecal), factores clínicos (diagnóstico más tardío en tumores derechos por presentación clínica más insidiosa) y moleculares (mayor incidencia de tumores MSI y mutaciones BRAF en colon derecho). No obstante, en relación a los tumores en estadio III, diversos estudios observan de manera consistente que los tumores de colon derecho presentan un peor pronóstico en términos de supervivencia independientemente del estado de MSI, mutaciones RAS o BRAF (*Missiaglia et al, 2014; Schrag et al, 2016*). Por el contrario, esta asociación también se observa en tumores en estadio II excepto para aquellos que presentan MSI, que constituye un conocido factor de buen pronóstico y está más frecuentemente asociado a tumores en colon derecho (*Weiss et al, 2011*).

4.2.2. Factores moleculares

➤ Inestabilidad de microsatélites.

El porcentaje de tumores que presentan inestabilidad de microsatélites es distinta según los estadios (22% en estadio II, 12% en estadio III, 2.5% en estadio IV). Su presencia constituye un factor pronóstico validado en cáncer de colon, aunque su impacto positivo en supervivencia se limita esencialmente a estadios iniciales de la enfermedad (*Dienstmann et al, 2015*). Se ha detectado, además, un menor beneficio derivado de la QT basada en 5-FU en pacientes con inestabilidad de microsatélites y estadio II (*Hutchins et al, 2011*), pudiendo incluso ser un tratamiento deletéreo para estos pacientes según concluyen algunos estudios (*Sargent et al, 2010*). Por ello, no se recomienda administrar QT adyuvante a los pacientes con CCR estadio II que presentan MSI, ya que presentan un mejor pronóstico y no parecen beneficiarse del tratamiento adyuvante con 5-FU. Como consecuencia de estos hallazgos, que son bastante consistentes en todos los estudios, la determinación de la expresión de los genes reparadores de ADN del sistema MMR se ha incorporado como una herramienta útil para la decisión terapéutica en estadio II principalmente, aunque las guías clínicas recomiendan su determinación en todos los pacientes con CCR independientemente del estadio, también por las implicaciones predictivas de respuesta a inmunoterapia en estadios más avanzados. Por el contrario, en el estadio

III, el valor pronóstico y predictivo de la inestabilidad de microsatélites no está tan establecido. Se ha observado que los pacientes en estadio III se benefician del tratamiento adyuvante independientemente de la presencia o no de inestabilidad de microsatélites (*Sinicrope et al, 2011*).

➤ Perfiles de expresión génica

El análisis de la expresión génica ha permitido mejorar la precisión diagnóstica, pronóstica y predictiva en diversas enfermedades neoplásicas. En el contexto del CCR, se han publicado múltiples firmas genómicas capaces de detectar subgrupos de pacientes intervenidos de cáncer de colon estadio II-III con mayor riesgo de recidiva o metástasis (*Wang et al, 2004; Sinicrope et al, 2015; D'Arrigo et al, 2005; Yamasaki et al, 2007*). Las dos plataformas genéticas más desarrolladas son Oncotype Dx® (única comercializada) y ColoPrint®.

En la plataforma de Oncotype Dx® se seleccionaron 7 genes con valor pronóstico y 6 genes con valor predictivo para ser validados como firma génica. La validación se llevó a cabo de forma prospectiva en 1436 pacientes participantes en el EC QUASAR, confirmándose su valor pronóstico y estableciéndose tres categorías de riesgo (bajo, intermedio y alto) en función de la tasa de recaída a los 3 años (12%, 18% y 22%, respectivamente, $p:0.046$) (*Gray et al, 2011*). Varios estudios posteriores han confirmado la utilidad pronóstica y predictiva de la firma en un número considerable de pacientes (*Venook et al, 2013; Yothey et al, 2013*). No obstante, la escasa capacidad discriminatoria entre los distintos grupos de riesgo con una diferencia de riesgos máxima del 10% entre los grupos de alto y bajo riesgo, junto con la baja probabilidad de recaída incluso en el grupo identificado como de alto riesgo han limitado su implantación en la práctica clínica.

En la plataforma ColoPrint® se seleccionó un grupo de 18 genes que divide a los pacientes en dos grupos de riesgo de recaída (bajo y alto riesgo) independientemente de factores clínico-patológicos. Su valor pronóstico ha sido validado en una cohorte independiente para la SLR ($HR=2.6$; $p=0,003$) y especialmente en pacientes con estadio II ($HR=3.3$; $p=0.02$) (*Salazar et al, 2011*). Estos resultados han sido además reproducidos en análisis posteriores con resultados similares (*Maak et al, 2013; Kopetz et al, 2015*). Sin embargo, su falta de validación en estudios prospectivos controlados, su ausencia de valor predictivo y la mayor complejidad de su técnica que requiere tejido congelado compromete su utilidad clínica. Además, esta firma pronóstica no pudo ser validada en parafina por lo que no se llegó a comercializar.

La clasificación molecular de consenso del CCR (*Guinney et al, 2015; Dienstmann et al, 2017*) también ha aportado información pronóstica basada en la expresión génica al identificar diferencias sustanciales en el pronóstico de los diversos

subtipos tumorales. Como hemos comentado previamente, globalmente el subgrupo CMS4 incluye los tumores con peor SLR y SG. No obstante, tras la recaída, los tumores CMS2 fueron los que presentaban una mayor supervivencia mientras que los CMS1 son los que se asociaron a un peor pronóstico.

➤ Otros (CDX2, RAS, BRAF)

CDX2 es un factor de transcripción específico esencial en el desarrollo intestinal, que se expresa tanto en la mucosa intestinal normal como en tumores de origen colónico. Este factor se ha identificado como un nuevo biomarcador pronóstico fácilmente evaluable mediante IHQ en CCR. En el estudio publicado en 2016 (*Dalerba et al, 2016*) se establece la pérdida de expresión de CDX2 (observada en torno al 5% de los pacientes) como un factor de mal pronóstico, que implica una peor evolución clínica en términos de SLE y SG en una cohorte retrospectiva de pacientes con CCR resecaed estadios II y III. Se observó además que la pérdida de expresión de CDX2 también se asociaba con mayor beneficio de la QT adyuvante en estos pacientes. Tal como concluyen los autores, estos hallazgos deben ser validados y confirmados en estudios prospectivos randomizados.

Además del conocido impacto predictivo de respuesta a determinados fármacos en el cáncer colorrectal metastásico (CCRm), las mutaciones de RAS y BRAF tienen también un valor pronóstico, al menos en algunos subgrupos de CCR. En un estudio recientemente publicado (*Smeby et al, 2018*), que incluyó 1197 muestras tumorales de CCR estadios I-IV, se evaluó el impacto pronóstico de dichas mutaciones en función de los distintos subgrupos de la clasificación de consenso del CCR. En este estudio se concluye que las mutaciones KRAS y BRAF-V600E se asocian con una peor supervivencia exclusivamente en tumores con MSS, limitándose además a ciertos subgrupos CMS (la mutación de BRAF confería un peor pronóstico en CMS1 MSS pero no en CMS1 MSI, con independencia de la localización tumoral, y se asociaban a estadio metastásico, y las mutaciones KRAS conferían un peor pronóstico solo en CMS 2-3, con independencia de la localización del tumor).

5. Tratamiento del cáncer colorrectal metastásico.

Aproximadamente un 25-30% de los casos debutan al diagnóstico con enfermedad metastásica (metástasis sincrónicas), y el 40% de los pacientes con estadios precoces eventualmente desarrollan metástasis a distancia (metástasis metacrónicas) tras la cirugía, por lo que globalmente cerca del 50-60% de los pacientes diagnosticados con cáncer de colon presentarán enfermedad metastásica a lo largo de la evolución de la enfermedad. La SG de los pacientes con enfermedad avanzada ha ido aumentando progresivamente en las últimas décadas hasta alcanzar una mediana de 2-3 años. Ello se debe a las mejoras experimentadas en las técnicas diagnósticas, con una detección más temprana de la enfermedad metastásica y una mejor caracterización molecular de la enfermedad (perfil de mutaciones KRAS, NRAS y BRAF, e inestabilidad de microsátélites), así como mejoras terapéuticas significativas incluyendo el abordaje quirúrgico de la enfermedad oligometastásica, el tratamiento locorregional de las metástasis hepáticas (distintas técnicas ablativas, SBRT/radiocirugía o radioembolización) y la incorporación de nuevos fármacos desarrollados en base a un mayor conocimiento de la biología molecular del CCR (*Van Cutsem et al, 2016*).

Existen actualmente múltiples fármacos aprobados para el tratamiento del CCRm que difieren tanto en mecanismo de acción como en su perfil de toxicidad. Estos fármacos incluyen quimioterápicos como 5-FU, capecitabina, raltitrexed, oxaliplatino, CPT11 o TAS102, antiangiogénicos como bevacizumab, aflibercept, ramucirumab o regorafenib, e inhibidores de EGFR como cetuximab o panitumumab. Estos antineoplásicos pueden ser empleados en distintas combinaciones y secuencias. Al margen de la secuencia empleada, que no está claramente establecida, de la exposición al mayor número de fármacos posible se deriva un mayor beneficio terapéutico (*Grothey et al, 2005; Cremolini et al, 2015*). Más recientemente se ha demostrado que el subgrupo de pacientes con CCRm y MSI tiene mal pronóstico cuando se trata con quimioterapia convencional, pero es particularmente sensible a la inmunoterapia ya que son tumores con una alta carga mutacional. De hecho, la FDA ha aprobado recientemente el Pembrolizumab (anticuerpo monoclonal anti-PD1, del inglés “Programmed Death-1”), y la combinación de Nivolumab (anticuerpo monoclonal anti-PD1) e Ipilimumab (anticuerpo monoclonal anti-CTLA4), inhibidores de los puntos de control del sistema inmunológico (del inglés “checkpoints inhibitors”), para el tratamiento de CCR MSI tras fracaso del tratamiento quimioterápico estándar (*Le et al, 2015*).

La estrategia terapéutica y los objetivos del tratamiento deben ser establecidos en base a diversos factores clínicos y moleculares, como la localización y extensión tumoral, la resecabilidad del tumor primario y de las metástasis, las características biológicas del tumor, las características clínicas del paciente, los síntomas derivados de la enfermedad y el perfil de toxicidad de los fármacos. En base a todos estos factores, ESMO recomienda clasificar a los pacientes esencialmente en 3 grupos: aquellos que presentan enfermedad metastásica resecable de inicio, aquellos que presentan enfermedad potencialmente resecable, en los que el objetivo terapéutico es alcanzar la máxima reducción del tamaño tumoral para conseguir la resecabilidad con intención curativa, y los pacientes con enfermedad diseminada irresecable, en los que los objetivos del tratamiento son el control de los síntomas y de la evolución de la enfermedad. En pacientes con enfermedad resecable, la cirugía es la estrategia fundamental con el objetivo de conseguir una resección completa R0, e irá acompañada de QT perioperatoria o adyuvante según los casos. En contraposición, el CCRm irresecable se considera incurable y el tratamiento de elección es la QT sistémica, ya que ha demostrado prolongar de forma significativa la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes en comparación con el mejor tratamiento de soporte (*Best et al, 2000*). En los pacientes con enfermedad irresecable en los que se consigue controlar la enfermedad tras un tratamiento de inducción, deben plantearse estrategias para disminuir la toxicidad acumulativa, como es la administración de tratamiento de mantenimiento, la posibilidad de intervalos libres del mismo o incluso el uso de técnicas ablativas si existe enfermedad oligometastásica. Antes de iniciar cualquier tipo de tratamiento las guías clínicas recomiendan determinar el estado mutacional de RAS/BRAF y determinar la estabilidad de microsatélites en todos los pacientes para identificar a aquellos candidatos a tratamiento con anti-EGFR (si RAS/BRAF es nativo) o inmunoterapia (tumores con MSI) (*Van Cutsem et al, 2016, García-Alfonso et al, 2015*).

De forma general y en ausencia de contraindicaciones médicas, el tratamiento estándar de primera línea consiste en esquemas de poliQT basados en FP y oxaliplatino o CPT11 (FOLFOX, XELOX, FOLFIRI), que han demostrado un incremento en la tasa de respuesta y supervivencia respecto a esquemas en monoterapia. Estos dobletes de oxaliplatino e CPT11 han resultado ser equivalentes en términos de eficacia terapéutica si se combinan con regímenes semejantes de FP, por lo que la diferencia fundamental entre ambos esquemas es el perfil de toxicidad: mayor diarrea y alopecia con CPT11, y mayor neurotoxicidad con oxaliplatino. A su vez, los dobletes de QT pueden combinarse con anticuerpos monoclonales dirigidos frente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o frente a EGFR en tumores sin mutaciones de RAS/BRAF para mejorar los resultados clínicos, reservándose el uso de tripletes de citotóxicos (FP con oxaliplatino e CPT11; FOLFOXIRI) con o sin bevacizumab para pacientes seleccionados y con tumores de colon derecho fundamentalmente (*Cremolini et al, 2015*). En contraposición, el tratamiento en monoterapia debe reservarse para pacientes frágiles con riesgo de mala

tolerancia a tratamiento intensivo por situación funcional o comorbilidades, pero que sean candidatos a QT activa.

Todos estos fármacos han demostrado eficacia en CCRm en primera y sucesivas líneas de tratamiento, por lo que la estrategia de segunda línea viene determinada por los fármacos previamente utilizados. De esta forma, en pacientes que han comenzado con bevacizumab en combinación con un doblete de quimioterapia en primera línea, las alternativas son cambiar el doblete de quimioterapia y añadir bevacizumab, aflibercept (sólo en combinación con FOLFIRI) o un anti-EGFR en pacientes sin mutaciones de RAS/BRAF, o bien reservar el anti-EGFR para tercera línea en este último caso tras una segunda línea que incluya un antiangiogénico. Por el contrario, en pacientes que han iniciado tratamiento con anti-EGFR y son bevacizumab-naive, se debe plantear el uso de antiangiogénicos en segunda línea si no existe contraindicación para ello. Por tanto, en la elección de segunda línea hay que tener en cuenta otros factores añadidos como la toxicidad presentada previamente, y el tipo y duración de la respuesta al tratamiento inicial. No obstante, a pesar de que todos estos esquemas consiguen tasas de respuesta objetiva tumoral del 40-60%, incluso los pacientes respondedores eventualmente desarrollan resistencia y fallecen por progresión tumoral, con medianas de SG que generalmente no superan los 2.5-3 años de vida en la mejor de las series.

En la Tabla 3 se resumen las distintas estrategias de tratamiento a lo largo de la evolución de la enfermedad en función del objetivo terapéutico y del perfil molecular, en base a las recomendaciones de la última guía de ESMO 2016 (*Van Cutsem et al, 2016*).

Tabla 3. Representación esquemática de las estrategias de tratamiento en CCRm basada en la última guía de ESMO 2016 (adaptada de Van Cutsem et al, 2016).

Estrategia	Perfil molecular	1º línea	2º línea	3º línea
Control de enfermedad	RAS/BRAF nativo	Doblete QT + terapia biológica	Doblete QT + terapia biológica	Regorafenib/TAS102
	RAS mutado	Doblete QT + Bevacizumab	Doblete QT + antiangiogénico	
	BRAF mutado	Doblete/ Triplete QT + Bevacizumab	Doblete QT + antiangiogénico	
Citorreducción	RAS/BRAF nativo	RAS/BRAF nativo	Doblete QT + anti-EGFR	Regorafenib/TAS102
	RAS mutado	RAS mutado	Doblete QT + Bevacizumab	
	BRAF mutado	RAS/BRAF nativo	Doblete QT + anti-EGFR	
Paciente frágil	Monoterapia con FP ± bevacizumab Anti-EGFR si RAS nativo Doblete QT a dosis reducidas?			

QT: Quimioterapia. FP: Fluoropirimidinas.

Posteriormente se ha constatado que en el escenario terapéutico del CCRm no sólo las mutaciones RAS/BRAF tienen impacto predictivo de respuesta a QT, sino que la localización del tumor primario también influye a la hora de seleccionar la mejor combinación de tratamiento antineoplásico. Un reciente análisis de 6 estudios randomizados (CRYSTAL, FIRE-3, CALGB80405, PRIME, PEAK y 20050181) ha confirmado el valor pronóstico de la localización tumoral que hemos comentado previamente, demostrando además que también tiene valor predictivo (Arnold et al, 2017). Este estudio analiza la eficacia de las terapias dirigidas (anti-EGFR y bevacizumab) en función de la localización tumoral y pone de manifiesto que existe un beneficio significativo en supervivencia con la combinación de QT y fármacos anti-EGFR en tumores localizados en colon izquierdo RAS nativo en comparación con QT sola o con bevacizumab (brazos control), mientras que estas diferencias no se observaban en tumores de colon derecho. Por otro lado, se observa una tendencia a una mejor tasa de respuesta en el brazo tratado con anti-EGFR en ambas localizaciones tumorales (colon derecho e izquierdo), pero dicho efecto era más pronunciado y significativo en tumores de colon izquierdo. Es decir, según estos resultados, los pacientes que más se benefician de la adición de anti-EGFR son los que presentan tumores RAS nativo localizados en colon izquierdo, constituyendo la localización tumoral, por lo tanto, un factor predictivo de respuesta a dichos fármacos en términos de SG, SLP y tasa de respuesta. En la Tabla 4 se representa la QT de elección de primera línea teniendo en cuenta también la localización tumoral, basado en la última actualización de consenso JSMO-ESMO (Yoshino et al, 2018).

Tabla 4. Representación esquemática de las estrategias de tratamiento en CCRm en primera línea teniendo en cuenta localización tumoral.

Estrategia	Perfil molecular	1° línea
Control de enfermedad	RAS/BRAF nativo	Izquierda: Doblete QT + anti-EGFR Derecha: Doblete QT + Bevacizumab
	RAS mutado	Doblete QT + Bevacizumab
	BRAF mutado	Doblete/Triplete QT + Bevacizumab
Citorreducción	RAS/BRAF nativo	Izquierda: Doblete QT + anti-EGFR Derecha: Triplete QT ± Bevacizumab (seleccionados) vs Doblete QT + anti-EGFR
	RAS mutado	Doblete QT + Bevacizumab
	BRAF mutado	Triplete/Doblete QT + Bevacizumab

QT: Quimioterapia.

6. Proteína Src.

6.1. Estructura, regulación y función

La proteína Src es el prototipo de la familia de las Src quinasas (SFK del inglés “Src-family kinases”) que incluye 9 miembros: Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck y Lyn, todos ellos con características estructurales similares y una gran homología en la secuencia primaria de aminoácidos. Se trata de una familia de proteínas de receptores tirosina quinasa citoplasmáticos que actúan como reclutadores de complejos de señalización intracelular y participan en la regulación de procesos celulares esenciales relacionadas con la carcinogénesis, como la proliferación y diferenciación celular, angiogénesis, migración, invasión, adhesión y apoptosis (*Chatzizacharias et al, 2012; Kim et al, 2009*).

Src es una proteína de 60 kDa compuesta por 536 aminoácidos y su estructura se divide en 7 partes: extremo N-terminal, dominio único, dominio SH1, SH2, SH3 y SH4 (dominios homólogos conservados en todos los miembros de la familia), y el extremo carboxi-terminal (C-terminal). El extremo C-terminal posee la región de regulación negativa y el dominio SH1 contiene el dominio catalítico (*Roskoski et al, 2004*) (Figura 6).

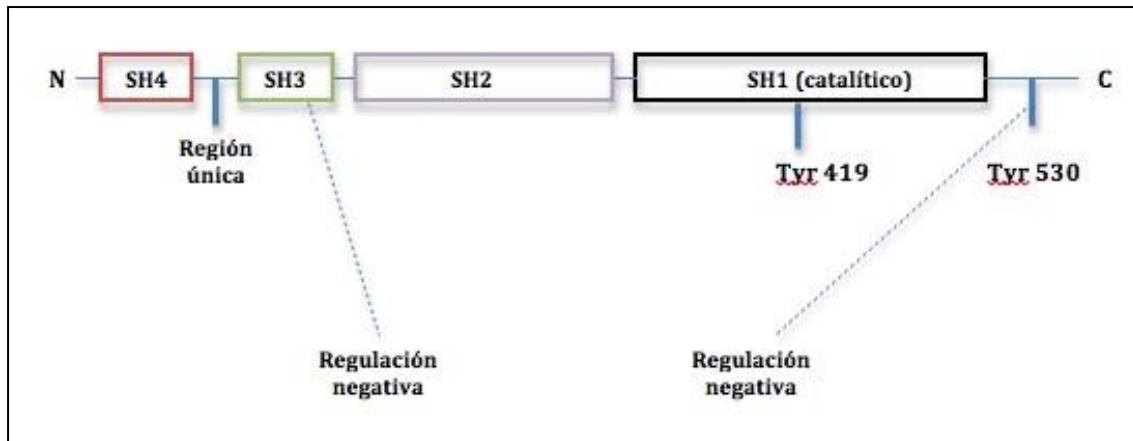


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de Src (adaptada de Chatzizacharias et al, 2012).

La regulación de la actividad de Src reside en procesos de fosforilación/desfosforilación. En su forma inactiva, el residuo Tyr530 del extremo C-terminal se encuentra fosforilado por acción de la proteína tirosina quinasa Csk y es reconocido por el dominio SH2 con el que se une. Al mismo tiempo, el dominio SH3 interacciona con la región de unión entre SH1 y SH2 formándose por todo ello una estructura proteica “cerrada” que impide la unión de substratos. La desfosforilación a nivel del residuo Tyr530 por parte de una tirosina fosfatasa induce un cambio conformacional de la proteína que permite la autofosforilación en el residuo Tyr419, presente en el bucle de activación del dominio SH1, promoviendo así la actividad quinasa de Src (Src activado; pSrc). En condiciones normales el 90-95% de Src se encuentra inactivo. Sin embargo, cuando existen mutaciones a nivel del residuo Tyr530, dominios SH2, SH3 o alteraciones en la actividad de la quinasa Csk, la proteína pSrc permanece constitutivamente activada.

Debido a su papel central en múltiples vías de señalización, la actividad aberrante de Src promueve la desregulación de numerosos procesos de carcinogénesis incluyendo invasión, migración, proliferación, angiogénesis y apoptosis, aunque los mecanismos moleculares no han sido aún plenamente dilucidados (Frame, 2002) (Figura 8).

Por un lado, Src interacciona con diversos receptores de membrana con actividad tirosin quinasa (RTKs) entre los que se encuentran EGFR y VEGFR, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), mediando en sus cascadas de señalización y facilitando la activación de diversas vías de transducción como RAS-MAPK, PI3K-AKT-mTOR o el factor activador de la transcripción 3 (STAT3), que intervienen en procesos de proliferación y supervivencia celular (Gargalionis et al, 2014). Adicionalmente, Src puede activar los RTKs en ausencia de sus ligandos de manera que en aquellos casos en los que existe una desregulación de Src se establece un

círculo vicioso en el que Src estimula estos receptores, que a su vez aumentan la actividad de Src (*Sirvent et al, 2012*).

También es conocida la interacción de Src con las integrinas de la membrana celular y proteínas del citoesqueleto regulando las capacidades celulares de adhesión y migración a través de procesos de fosforilación de diversos sustratos. La activación aberrante de Src promueve, entre otros: 1) la fosforilación e inactivación de la proteína p120 cadherina, una proteína transmembrana de adhesión celular que forma conexiones intercelulares en las uniones adherentes (adherens junctions), 2) la fosforilación de las quinasas de adhesión focal (FAK) formándose un complejo que interacciona con otras proteínas como la paxilina, p130cas o las GTPasas de la familia Rho, todas ellas componentes de las placas de adhesión (estructuras que conectan los componentes de la matriz extracelular con estructuras intracelulares), modulando así la actividad de los contactos focales intercelulares, y 3) la activación de metaloproteasas de la matriz extracelular. Por todos estos mecanismos, la activación de Src induce desestabilización de la adhesión celular y estimula la motilidad e invasividad celular. Src constituye, por tanto, un importante componente en la transición que se produce cuando las células epiteliales adquieren rasgos mesenquimales en los estadios iniciales de la invasión tumoral y en el desarrollo de metástasis (*Patel et al, 2016*).

Src además está involucrada en la regulación de la angiogénesis a través de dos mecanismos. En primer lugar se reconoce el papel de Src como regulador positivo de la expresión génica de factores de crecimiento angiogénicos (como el VEGF o la interleuquina 8) a través de factores de transcripción como STAT3. En segundo lugar, Src interviene en la cascada de señalización tras la estimulación del VEGFR mediando en la activación de señales necesarias para la neoformación y permeabilidad vascular (*Kim et al, 2009*).

6.2. Activación de Src en cáncer: implicaciones predictivas y pronósticas

Se ha demostrado un aumento de la expresión o actividad de la proteína quinasa Src en una amplia variedad de neoplasias humanas como el cáncer de mama, ovario y colon, y con menos frecuencia en melanoma, tumores gástricos, pancreáticos y pulmonares, así como en tumores de cabeza y cuello y del sistema nervioso central (*Chatzizacharias et al, 2012*). En algunos de ellos, la activación de Src se ha asociado con distintas características clínico-patológicas de la enfermedad y con un fenotipo más agresivo y/o un peor pronóstico, aunque no todos los estudios son consistentes. Este hecho podría deberse a la falta de consenso en la definición de “Src activado”, los distintos métodos de detección empleados (IHQ, reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), análisis por Western blot...), los diferentes anticuerpos usados (para detección de Src total, Src activada...) o las diversas histologías y estadios tumorales estudiados. En cáncer de mama, por ejemplo, se han comunicado datos sobre la correlación entre la expresión de Src y el tamaño tumoral, grado de diferenciación celular o expresión de HER2. La mayor actividad de Src se asoció además con una peor supervivencia en algunas series (*Elsberger et al, 2010; Elsberger et al, 2009*). No obstante, estas conclusiones no se alcanzan en otros estudios similares, que incluso obtienen resultados contrarios (*Campbell et al, 2008*). En cáncer de pulmón hay autores que han observado una asociación entre la expresión de Src y un mayor tamaño tumoral en histología no escamosa (*Masaki et al, 2003*) o la asociación con una pobre diferenciación tumoral en histología escamosa (*Mazurenko et al, 1992*).

Por otro lado, se ha demostrado que la activación de Src también puede mediar la resistencia a determinados agentes quimioterápicos en líneas celulares de diversas neoplasias (*Duxbury 2004; Le et al, 2011; Guo et al, 2018*). Así, estudios preclínicos realizados con líneas celulares de carcinoma de ovario muestran que la activación de Src se correlaciona con resistencia a platino, y que dicha resistencia es capaz de revertirse mediante la inhibición farmacológica con inhibidores específicos de Src (*Pengetnze et al, 2003*).

6.3. Papel de Src en cáncer colorrectal

Al igual que ocurre en otros tumores, la actividad de Src juega un papel importante en la progresión tumoral del CCR, observándose un incremento de la actividad de Src en pólipos premalignos en comparación con el tejido normal adyacente o fibroblastos, así como una sobreexpresión de Src en CCR entre 5-7 veces superior a la expresión en mucosa colónica no tumoral determinado por inmunoblot (*Talamonti, et al, 1993*). Estos datos sugieren que la activación de Src es un evento temprano en la carcinogénesis del CCR, aunque tanto la actividad quinasa como la expresión de la proteína fosforilada es mayor en tejido metastásico que en el tejido tumoral primario. Igualmente existen diferencias del nivel de activación de Src en tejido metastásico en función de la localización, observándose que las metástasis abdominales extrahepáticas, pélvicas y torácicas muestran mayor nivel de Src activado que las metástasis hepáticas (*Termuhlen et al, 1993*). Estudios en líneas celulares de CCR muestran que la sobreexpresión de Src estimula el crecimiento e invasividad tumoral (*Leroy et al, 2009; Sirvent et al, 2012*).

Respecto a su potencial utilidad pronóstica o predictiva en CCR, se ha demostrado que la activación de Src, determinado por técnicas de Western blot (immune complex kinase assay) o IHQ, constituye un factor de mal pronóstico independiente en todos los estadios de la enfermedad (*Allgayer et al, 2002*), o se

asocia con una reducción del intervalo libre de recurrencia (Heer et al, 2008). Por otra parte, existen estudios que evalúan la asociación entre pSrc y la resistencia a fármacos empleados en el tratamiento del CCR, como el oxaliplatino, observándose *in vitro* una mayor sensibilidad a este fármaco en células tumorales con expresión de variantes de Src por mutaciones puntuales que dan lugar a la pérdida de su actividad quinasa (Griffiths et al, 2004).

Más recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que existe una estrecha correlación entre la resistencia a oxaliplatino y la expresión de pSrc en un estudio con líneas celulares de CCR, de manera que las líneas con alta expresión de pSrc presentaron valores de IC50 notablemente superiores a los observados en líneas celulares con baja expresión de Src, independientemente de otros datos del perfil molecular como las mutaciones de RAS (Figura 4) (Perez et al, 2016).

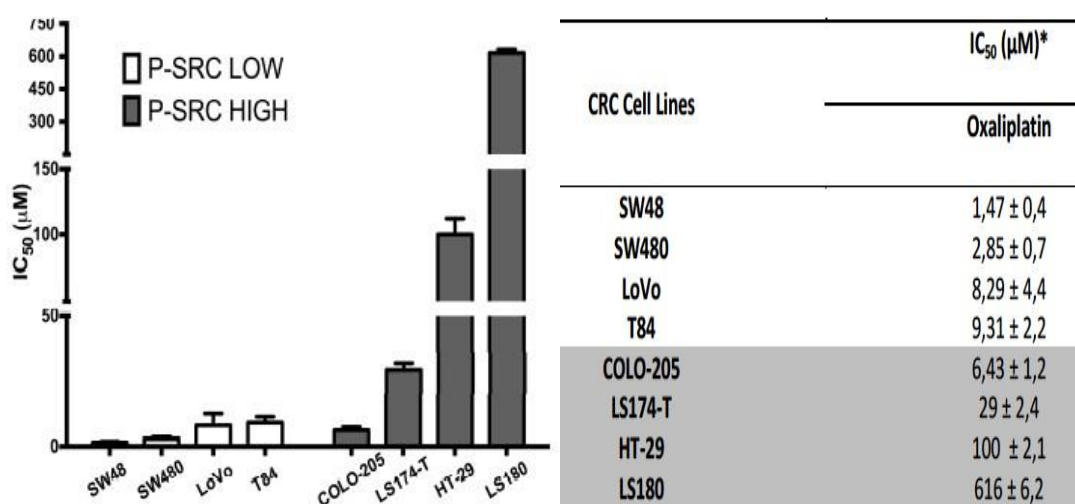


Figura 4. Valores IC50 para oxaliplatino en líneas celulares de CCR (las líneas con alta expresión de pSrc están sombreadas en gris).

Es decir, se observó que la activación de la tirosina-quinasa citoplasmática Src, evaluada con anticuerpos específicos frente al residuo Tyr419 fosforilado, inducía resistencia a oxaliplatino y se confirmó, además, que la inhibición farmacológica de Src era capaz de revertir dicha resistencia. Este hecho se observó tanto en líneas con alta expresión innata de pSrc (HT-29), como en líneas que inicialmente presentaban una baja expresión endógena pero con sobre-expresión ectópica de pSrc inducida mediante transfección con plásmidos del gen c-Src (Sw480 y T84). Las líneas transfectadas sobre-expresaban pSrc, y desarrollaban resistencia a oxaliplatino, y se re-sensibilizaban nuevamente al oxaliplatino en combinación con dosis subletales de un inhibidor farmacológico de Src (PP2) (Tabla 5).

Tabla 5. Ensayos de citotoxicidad con oxaliplatino y PP2 (inhibidor de Src) en líneas celulares de CCR.

Transfectant	IC ₅₀ (μM)*		
	PP2	Oxaliplatin	Oxaliplatin + PP2
SW480 ^P	14,85 ± 3,8	5,50 ± 1,6	1,23 ± 1,3
SW480 ^{src+}	16,67 ± 6,8	10,44 ± 2,3	3,29 ± 1,0
T84 ^P	11,53 ± 3,2	8,20 ± 1,4	1,8 ± 2,2
T84 ^{src+}	11,64 ± 5,2	14,75 ± 2,1	6,39 ± 1,7
HT-29	7,98 ± 9,93	100 ± 2,1	8,97 ± 1,1

Resultados similares fueron observados en modelos PDX (del inglés “patient-derived xenografts” o xenoinjertos derivados del paciente) generados en nuestro laboratorio a partir de metástasis hepáticas de pacientes con CCRm sometidos a resección quirúrgica de sus metástasis, y que fueron implantadas ortotópicamente en el hígado de ratones desnudos. Se seleccionaron 4 modelos PDX, 2 con alta expresión de pSrc (ambos KRAS mutado y BRAF nativo, y uno de ellos con MSI) y 2 con baja expresión (uno RAS/BRAF nativo, y el otro KRAS mutado; ambos con MSS). En estos modelos observamos que el dasatinib, un inhibidor de Src, en combinación con oxaliplatino, prolongaba significativamente la supervivencia de los PDX con alta expresión de Src, frente al tratamiento con cualquiera de los dos fármacos en monoterapia o frente al tratamiento con solución sin fármaco (control). Sin embargo, este sinergismo no se observó en modelos con baja expresión de pSrc, ni con la combinación de dasatinib con 5-FU.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El cáncer colorrectal es una enfermedad neoplásica molecularmente heterogénea y compleja, que comprende un espectro de tumores con una gran variabilidad en cuanto a su comportamiento biológico y su susceptibilidad a distintos fármacos. La identificación de nuevos biomarcadores pronósticos y/o predictivos resulta de trascendental importancia para una estratificación pronóstica más precisa y una selección más personalizada de las terapias más eficaces para cada paciente. Src pertenece a una familia de receptores tirosina quinasa citoplasmáticos que juega un papel central en la regulación de diversas vías de señalización implicadas en la regulación de múltiples procesos celulares relevantes en la carcinogénesis, como son la proliferación, invasión, migración, angiogénesis y apoptosis. Además se ha demostrado que la activación de Src se asocia a un fenotipo tumoral más agresivo y puede mediar la resistencia a determinados agentes quimioterápicos, resistencia que puede ser farmacológicamente revertida con inhibidores específicos de Src.

En base a todo ello, la hipótesis de nuestro trabajo es que la sobreexpresión tumoral de Src activado o pSrc se correlaciona con un peor pronóstico y con una mayor resistencia a esquemas de QT basados en oxaliplatino en pacientes con CCR. Src podría ser, por lo tanto, un biomarcador de potencial utilidad clínica para mejorar la estratificación pronóstica de los pacientes y para la identificación de subgrupos de pacientes tributarios de nuevas estrategias terapéuticas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo global del proyecto es evaluar la expresión tumoral de pSrc y su utilidad clínica como biomarcador en cáncer de colon, y analizar su papel como factor pronóstico de la evolución natural de la enfermedad y como factor predictivo de resistencia al tratamiento con QT basada en oxaliplatino. Para ello se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación mediante técnicas de IHQ de la expresión tumoral de pSrc en matrices de tejido tumoral parafinado (“tissue microarrays”, TMA) de 487 pacientes con cáncer de colon estadio II-III y 154 pacientes con cáncer de colon estadio IV diagnosticados y tratados en el Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) de Sevilla.
- Evaluación de la correlación entre la expresión tumoral de pSrc y la SLE y SG en pacientes con cáncer de colon estadio II-III tratados mediante resección quirúrgica, con o sin tratamiento quimioterápico adyuvante (FP +/- oxaliplatino).
- Evaluación de la correlación entre la expresión tumoral de pSrc y la tasa de respuesta objetiva, la SLP y la SG de pacientes con cáncer de colon estadio IV con diferentes perfiles moleculares (RAS y BRAF nativos o mutados, y tumores con o sin inestabilidad de microsatélites), tratados con esquemas de QT basados en oxaliplatino.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio.

Observacional, de cohorte y retrospectivo.

2. Población de estudio y criterios de inclusión.

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

- Cohorte de pacientes diagnosticados de CCR estadio II-III.

En esta cohorte de estudio se incluyeron un total de 487 pacientes consecutivos diagnosticados de CCR estadio II y III entre el año 2000 y 2010 en el HUVR de Sevilla. Estos pacientes fueron tratados mediante resección quirúrgica del tumor primario, con o sin QT adyuvante. Globalmente, salvo contraindicación médica (p.ej. complicaciones postquirúrgicas o comorbilidades importantes), recibieron QT adyuvante los pacientes con cáncer de colon estadio III o estadio II de alto riesgo. Se consideraron estadio II de alto riesgo los casos que cumplían alguna de las siguientes condiciones: T4, G3, <12 ganglios analizados, obstrucción o perforación intestinal como debut de la enfermedad o presencia de invasión vascular. La QT estándar en ese periodo de estudio consistía en FP en monoterapia (5-FU o capecitabina) y, desde 2005, FP en combinación con oxaliplatino (esquemas FOLFOX o XELOX) en pacientes con estadio III y < 70 años, salvo contraindicación médica para ello.

- Cohorte de pacientes diagnosticados de CCRm o estadio IV.

En esta cohorte de estudio se incluyeron 154 pacientes diagnosticados de CCR avanzado y tratados en el HUVR en el periodo 2007-2014. Estos pacientes recibieron QT para enfermedad metastásica que podía consistir en un doblete de QT con FP y oxaliplatino o irinotecán +/- antiangiogénicos o anti-EGFR (si RAS nativo).

Los pacientes incluidos en este estudio debían cumplir los siguientes criterios de inclusión: 1) diagnóstico histológico confirmado de CCR; 2) estadíos II - III o IV según la clasificación TNM; 3) resección quirúrgica con intención curativa en aquellos pacientes estadio II-III; 4) muestra de tejido tumoral parafinado excedente disponible para ensayos moleculares (determinación de inestabilidad de microsatélites y mutaciones RAS/BRAF en la cohorte de pacientes estadio IV) o inmunohistoquímicos adicionales (evaluación de la expresión proteica de pSrc en tejido tumoral parafinado de todos los pacientes) y 5) información clínica de calidad adecuadamente registrada en su historia clínica.

3. Recogida de información clínica y consideraciones éticas.

El proyecto de investigación fue valorado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUVR de acuerdo al procedimiento habitual del centro. Todo el proyecto se atuvo a los principios éticos universales recogidos en la declaración de Helsinki y a la legalidad vigente. La información clínica fue recogida del historial médico del paciente de forma retrospectiva, incluyendo los siguientes parámetros: sexo, edad, peso, talla, estado funcional, niveles plasmáticos basales de CEA, fecha de diagnóstico, estadio TNM al diagnóstico, fecha y tipo de cirugía del tumor primario (estadio II-III y estadio IV si existía), presentación clínica (obstrucción o perforación intestinal), sublocalización del tumor primario, localización de la afectación metastásica, subtipo histológico, diferenciación histológica tumoral, invasión vascular o perineural, características moleculares del tumor (inestabilidad de microsatélites, mutaciones KRAS, NRAS y BRAF si disponibles), indicación de QT adyuvante (estadio II-III), tipo de QT recibida (tanto adyuvante como de primera línea de enfermedad metastásica), fecha de recaída tumoral en estadio II-III o mejor respuesta al tratamiento QT y fecha de progresión de enfermedad en estadio IV, y fecha de fallecimiento o de última visita en pacientes vivos. La estadificación se llevó a cabo de acuerdo con la clasificación de la AJCC-TNM (7ª edición) (*Edge et al, 2010*). El estado funcional de los pacientes se evaluó según la escala del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (*Oken et al, 1982*). El tratamiento de los datos de carácter personal se atuvo a la normativa vigente, el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. Finalmente se elaboró una base de datos en la que se integró la información molecular y clínica para analizar las correlaciones de interés.

4. Gestión de las muestras tumorales.

Un total de 641 muestras tumorales fijadas en formol e incluidas en parafina fueron proporcionadas por el Biobanco del HUVR procedentes del Departamento de Anatomía Patológica. Las muestras tumorales fueron evaluadas y seleccionadas por un patólogo para generar los TMAs. En total se diseñaron 25 TMAs: 20 TMAs con las 487 muestras tumorales de pacientes con CCR estadio II-III y 5 TMAs con las 154 muestras de tumores metastásicos. Cada TMA incluía dos muestras de tejido tumoral de cada paciente y además 3 muestras duplicadas de tejido colónico no tumoral.

5. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de pSrc.

De cada TMA se realizaron secciones de 5 μ , que se desparafinaron en xilol y posteriormente se rehidrataron en una serie graduada de alcoholes. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena introduciendo las secciones en una solución acuosa de H₂O₂ al 3% durante 30 minutos y, después se bloquearon los sitios de unión inespecíficos incubando con buffer de bloqueo (ROCHE) durante media hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con el anticuerpo anti pSrc 1:300 (phospho Y418, ab4816, Abcam que reconoce la Tyr 419 fosforilada en humanos), toda la noche a 4°C y tras varios lavados en buffer tris 0,05 M, se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (EnVision™ Peroxidase-labelled polymer-linked secondary antibodies, Dako).

La visualización de la inmunorreacción se realizó usando 3,3'diaminobenzidina como sustrato cromogénico de la peroxidasa de acuerdo con el protocolo facilitado por el fabricante (EnVision, Dako). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se realizó una evaluación semicuantitativa utilizando un aumento de 200x en un microscopio Zeiss. La reactividad del anticuerpo se localizó en el citoplasma celular y se valoró como: 0= ausencia de señal, 1= señal leve, 2= señal moderada y 3= señal intensa, evaluándose cada caso por duplicado (Figura 5). Para una correcta valoración de la inmunotinción se utilizaron controles negativos donde se omitió la incubación con el anticuerpo primario y controles positivos de tejidos que expresaban la proteína para asegurar así la especificidad de la señal.

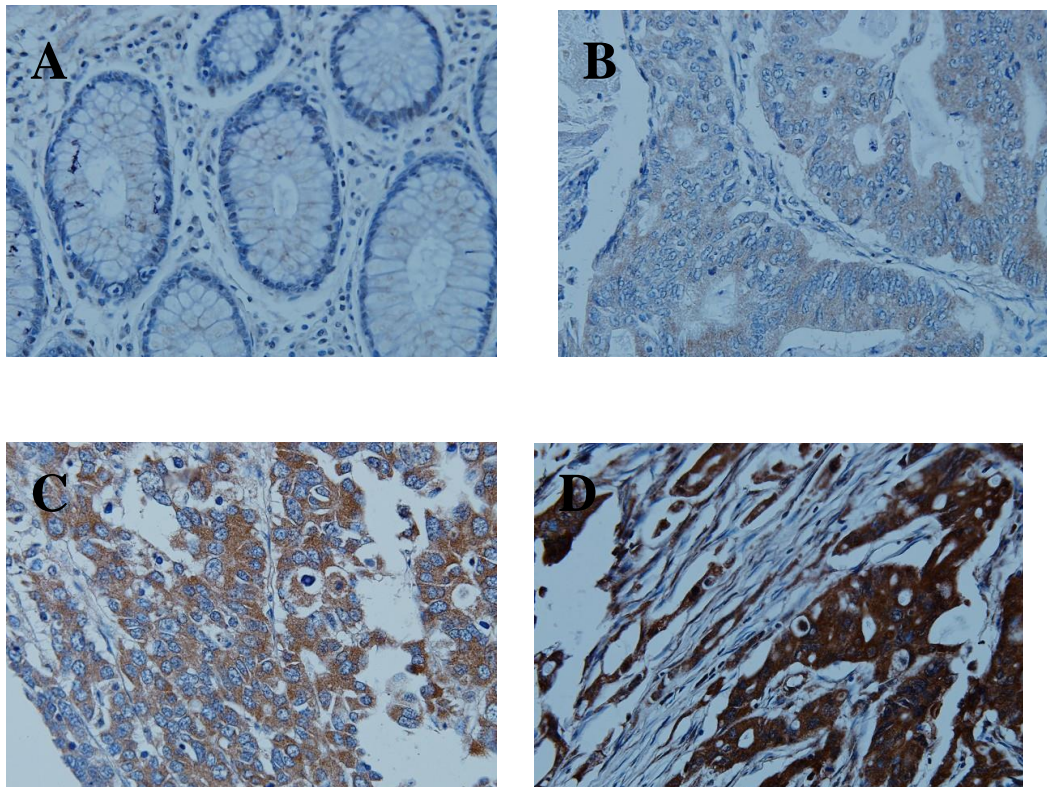


Figura 5. Fotos ilustrativas de la expresión tumoral de pSrc valorada por IHQ. A: Ausencia de expresión pSrc (0). B: Expresión leve de pSrc (+1). C: Expresión moderada de pSrc (+2). D: Expresión intensa de pSrc (+3).

6. Extracción de ADN.

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 12 secciones de 10 μm de tejido tumoral parafinado utilizando el kit de extracción QIAmp DNA FFPE (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes del inicio del protocolo de extracción, el exceso de parafina fue eliminado del bloque con un bisturí, y los cortes de tejido parafinado se incubaron con una solución de desparafinización (Qiagen) a 56°C durante toda la noche. La concentración de ADN total (ng/ml) obtenido se calculó a partir del valor de absorbancia obtenido en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific; MA, USA). La pureza de las muestras se valoró mediante los ratios de las absorbancias 260/280 nm y 230/280 nm, que en todas las muestras oscilaba entre 1.6-2 y 2-2.2, respectivamente, óptimo para muestras diluidas en agua estéril desionizada. Además las muestras de ADN también fueron cuantificadas de manera más precisa utilizando el kit QuantiFluor dsDNA System

(Promega Corporation, Madison, USA) o por QUBIT (Thermo Fisher Scientific; MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de ADN se diluyó a la concentración de trabajo requerida para cada técnica de análisis.

7. Análisis de inestabilidad de microsátélites.

Entre 1-2 ng de ADN extraído de las muestras de tejido tumoral se utilizó para el análisis de la MSI utilizando el kit MSI Analysis System, Versión 1.2 (Promega Corporation, Madison, USA). Este sistema se basa en la amplificación de ADN mediante PCR con marcaje fluorescente para la determinación de MSI en células humanas. El análisis incluye un panel de 7 marcadores previamente validados; 5 marcadores mononucleótidos casi monofórmicos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27), con una alta sensibilidad y especificidad en la detección de MSI, y 2 marcadores pentanucleótidos (Penta C y Penta D) como marcadores internos para la detección de contaminación de las muestras (*Murphy et al, 2006*).

La mezcla de PCR contenía 5.85 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de Gold STAR 10X Buffer, 1 µl de MSI 10X Primer Pair Mix, 0.15 µl de AmpliTaq Gold DNA Polimerasa y 2 µl de ADN y se realizó en los termocicladores Veriti 96-well Thermal Cycler y SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aplicando las siguientes condiciones de amplificación: 95°C 11 minutos; 96°C 1 minuto; 10 ciclos a 94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 70°C 50 segundos; 20 ciclos a 90°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 70°C 50 segundos; 60°C 30 minutos; mantenimiento a 4°C. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis capilar utilizando el secuenciador ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) y el análisis de datos se realizó utilizando el software Genemapper (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Los resultados se analizaron según las recomendaciones de los criterios de Bethesda (*Umar et al, 2004*), que señalan que la alteración de 2 o más de los 5 marcadores debido a deleciones o inserciones de una secuencia repetitiva son indicativos de MSI.

8. Determinación del perfil mutacional RAS/BRAF.

La determinación de mutaciones RAS (exones 2, 3 y 4 de KRAS y NRAS) y BRAF (V600E) en las muestras de CCR metastásico se llevó a cabo mediante secuenciación masiva (NGS - del inglés “Next Generation Sequencing”) utilizando el panel “Ion Ampliseq Colon and Lung Cancer Research Panel v2” (ThermoFisher Waltham, EEUU). El análisis del ADN tumoral se realizó con un Ion PGM Sequencer (ThermoFisher, Waltham, EEUU) cuya tecnología está basada en la detección de protones (iones de hidrógeno) liberados durante el proceso de polimerización del ADN (Liu *et al*, 2012). Para la creación de las librerías se partió de 10 ng de ADN en 6 μ l por librería, utilizando el kit IonAmpliseq Library 2.0 siguiendo las instrucciones del proveedor (ThermoFisher, Waltham, EEUU). Las muestras de ADN se amplificaron por PCR multiplex utilizando el Ion AmpliSeq Library kit 2.0 y el amplicón Ion Ampliseq Colon and Lung Cancer Research Panel v2. La secuenciación se realizó en un equipo Ion Torrent Personal Genome Machine (Ion PGM; ThermoFisher, Waltham, EEUU). Los datos crudos resultantes de la secuenciación fueron procesados con el Torrent Suite Software v5, para generar lecturas filtradas por los controles de calidad del software. Todo este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Cáncer Hereditario y el Laboratorio de Oncología Trasnacional del Hospital Universitario 12 de Octubre.

9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de este estudio se ha llevado a cabo con el programa IBM SPSS 20.0 en entorno Windows. Se caracterizaron las variables clínicas más relevantes mediante estadística descriptiva. La asociación entre la expresión de pSrc y diversas variables categóricas de interés se llevó a cabo mediante la prueba de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. Las curvas de supervivencia se analizaron mediante el método de Kaplan-Meier, y las diferencias de supervivencia en función de la expresión de pSrc se evaluaron mediante el test de log-rank. La significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

La valoración de la expresión de pSrc en tejido tumoral, como hemos indicado previamente, se clasificó en 4 grupos (0-3), aunque para el análisis estadístico se clasificó a los pacientes en dos grupos. En la primera cohorte de pacientes (CCR estadio II-III) se clasificaron como grupo de baja expresión los tumores cuya intensidad de expresión era inferior o igual a 2, y como grupo de alta expresión aquellos cuyo valor era igual a 3. En la segunda cohorte (CCR estadio IV), debido al menor tamaño poblacional y al pequeño número de pacientes con alta expresión, la

clasificación en dos grupos se hizo de la siguiente manera: grupo con ausencia de expresión de pSrc (pSrc negativo) si el valor era igual a 0; y grupo con expresión de pSrc (pSrc positivo) si dicho valor era distinto a 0 (1-3).

La SLE en los pacientes con estadio II y III se calculó desde la fecha de la intervención quirúrgica del tumor primario hasta la fecha de la recidiva tumoral o del último contacto en ausencia de recidiva. La SLP (en estadio IV) se definió como el periodo de tiempo desde el inicio de tratamiento QT de primera línea para enfermedad metastásica hasta la fecha de documentación de la progresión de enfermedad (o fecha de último contacto en pacientes que no habían progresado). La SG se estimó desde la fecha del diagnóstico de la enfermedad tumoral (en el caso de la segunda cohorte de estudio, fecha de diagnóstico de enfermedad metastásica) hasta la fecha del fallecimiento por cualquier causa (progresión tumoral, toxicidad, muerte perioperatoria, enfermedad no tumoral u otras) o del último contacto en pacientes vivos. La evaluación de la respuesta tumoral se realizó de acuerdo a los criterios RECIST v1.1 (*Eisenhauer et al, 2009*): respuesta completa (RC) que se define como la desaparición de todas las lesiones medibles y evaluables; respuesta parcial (RP) como la reducción $\geq 30\%$ de la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana; enfermedad estable (EE) se define como una reducción menor del 30% o un crecimiento menor o igual al 20%; y la progresión de enfermedad (PE) se considera si existe un crecimiento $>20\%$ de la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana o hay aparición de alguna lesión nueva.

El análisis multivariable en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III para la obtención de predictores de supervivencia libre de enfermedad y global se realizó mediante el método de riesgos proporcionales de Cox. Las variables incluidas en el modelo fueron las siguientes: edad (< 65 vs > 65 años), sexo (mujer vs hombre), ECOG (0-1-2-3), valor de CEA prequirúrgico (normal vs elevado vs no determinado (ND)), cuadro obstructivo como debut de la enfermedad (no vs sí), perforación intestinal al diagnóstico (no vs sí), estadio TNM (II vs III), administración de QT adyuvante (no vs sí) y grado de intensidad de la expresión de pSrc (≤ 2 vs 3).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Cohorte 1: Pacientes con cáncer colorrectal estadio II-III.

1.1. Características clínicas de los pacientes

La primera cohorte de nuestro estudio está constituida por 487 pacientes diagnosticados de CCR estadio II-III. Las principales características clínicas y demográficas de esta cohorte se muestran en la Tabla 6.

Aproximadamente la mitad de los pacientes fueron varones (56.9%), con una mediana de edad al diagnóstico de 67.8 años (rango 28-90) y la mayoría de ellos presentaban un buen estado funcional (ECOG 0-1: 74%). El 17.7% de los casos debutaron al diagnóstico con cuadro de obstrucción intestinal y el 7.4% con cuadro de perforación intestinal, requiriendo en ambos casos intervención quirúrgica urgente.

La localización más frecuente del tumor primario fue colon izquierdo o recto (66.3%), mientras que el 33.7% de los tumores se localizaron en colon derecho.

Desde el punto de vista terapéutico, el 61.2% recibió tratamiento QT adyuvante; un 38% de ellos con FP en monoterapia y un 22.2% FP en combinación con oxaliplatino.

Todas las características clínicas están bien balanceadas entre los dos subgrupos de pacientes (estadio II y III) excepto, como es esperable, el tratamiento adyuvante: mientras que el 78.9% de los pacientes diagnosticados en estadio III recibieron tratamiento adyuvante, más de la mitad de los pacientes con estadio II no lo recibieron, empleándose la combinación de fluoropirimidinas y oxaliplatino con más frecuencia en el estadio III (38.1% vs 7.9 % en estadio III vs II, respectivamente).

Tabla 6. Características clínicas de la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

	Población total 487 (100%)	Población estadio II 240 (49.3%)	Población estadio III 247 (50.7%)
Edad (años)			
• Mediana (rango)	67.8 (28-90)	66.8 (28-90)	68.0 (35-88)
Sexo			
• Hombre	277 (56.9%)	156 (65.0%)	121 (49.0%)
• Mujer	210 (43.1%)	84 (35.0%)	126 (51.0%)
ECOG			
• 0	278 (57.1%)	159 (66.3%)	119 (48.2%)
• 1	83 (17.0%)	26 (10.8%)	57 (23.1%)
• 2	25 (5.1%)	8 (3.3%)	17 (6.9%)
• 3	7 (1.4%)	1 (0.4%)	6 (2.4%)
• Desconocido	94 (19.3%)	46 (19.2%)	48 (19.4%)
CEA prequirúrgico			
• Normal	118 (24.2%)	69 (28.7%)	49 (19.8%)
• Elevado	150 (30.8%)	74 (30.8%)	76 (30.8%)
• ND	219 (45.0%)	97 (40.4%)	122 (49.4%)
Obstrucción intestinal			
• Sí	86 (17.7%)	40 (16.7%)	46 (18.6%)
• No	401 (82.3%)	200 (83.3%)	201 (81.4%)
Perforación intestinal			
• Si	36 (7.4%)	19 (7.9%)	17 (6.9%)
• No	451 (92.6%)	221 (92.1%)	230 (93.1%)
Localización tumoral			
• Ciego y colon ascendente	105 (21.6%)	50 (20.8%)	55 (22.2%)
• Colon transverso	59 (12.1%)	28 (11.7%)	31 (12.6%)
• Colon descendente	125 (25.6%)	63 (26.2%)	62 (25.2%)
• Sigma	183 (37.6%)	94 (39.2%)	89 (36.0%)
• Recto	15 (3.1%)	5 (2.1%)	10 (4.0%)
QT adyuvante			
• No	189 (38.8%)	137 (57.1%)	52 (21.2%)
• Sí	298 (61.2%)	103 (42.9%)	195 (78.9%)
○ FP	185 (38.0%)	84 (35.0%)	101 (40.9%)
○ FP +OX	113 (22.2%)	19 (7.9%)	94 (38.1%)
Seguimiento de pacientes (meses)			
• Mediana (rango)	65.7 (0-169)	80.7 (0.3-169)	58.0 (0.0-149)
Recidiva			
• Sí	137 (28.1%)	54 (22.5%)	83 (33.6%)
• No	350 (71.9%)	186 (77.5%)	164 (66.4%)
Éxito			
• Sí	176 (36.1%)	83 (34.6%)	93 (37.7%)
• No	311 (63.9%)	157 (65.4%)	154 (62.3%)

CEA: Antígeno carcinoembrionario. ND: No determinado. QT Quimioterapia. FP: Fluoropirimidinas. OX: Oxaliplatino.

1.2. Características histopatológicas y moleculares de los tumores

En la Tabla 7 se resumen las características histopatológicas y moleculares de los tumores de esta cohorte.

El subtipo histológico más frecuente fue el adenocarcinoma (95.1%), y la mayor parte de los casos fueron tumores bien o moderadamente diferenciados (35.1% y 57.5%, respectivamente), sin invasión vascular (95.9%) ni perineural (99.8%).

Siguiendo la clasificación TNM, el 49.3% de los pacientes presentaban estadio II al diagnóstico y el 50.7% correspondían a estadio III.

En relación a la expresión de pSrc, ésta fue evaluable en 409 muestras (84%). La intensidad de la expresión de pSrc se distribuyó de la siguiente manera: 144 pacientes (29.6%) presentaron una expresión nula (0), 118 pacientes (24.2%) expresión débil (+1), 103 (21.1%) expresión moderada (+2) y 44 pacientes (9.0%) expresión alta (+3).

Tabla 7. Características histopatológicas y moleculares de la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

	Población total 487 (100%)	Población estadio II 240 (49.3%)	Población estadio III 247 (50.7%)
Subtipo histológico			
• Adenocarcinoma	463 (95.1%)	229 (95.4%)	234 (94.7%)
• Carcinoma mucinoso	10 (2.1%)	4 (1.7%)	6 (2.4%)
• Carcinoma anillo sello	7 (1.4%)	2 (0.8%)	5 (2.0%)
• Medular	2 (0.4%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)
• Coloide	5 (1.0%)	4 (1.7%)	1 (0.4%)
Estadio T patológico			
• pT1	2 (0.4%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)
• pT2	16 (3.3%)	1 (0.4%)	15 (6.1%)
• pT3	366 (75.2%)	83 (76.3%)	183 (74.1%)
• pT4	102 (20.9%)	54 (22.5%)	48 (19.4%)
Estadio N patológico			
• pN0	240 (49.3%)	240 (100.0%)	-
• pN1	162 (33.3%)	-	162 (65.6%)
• pN2	85 (17.5%)	-	85 (34.4%)
Estadio TNM			
• II	240 (49.3%)		
○ IIA	185 (38.0%)		
○ IIB	55 (11.3%)		
• III	247 (50.7%)		
○ IIIA	17 (3.5%)		
○ IIIB	146 (30.0%)		
○ IIIC	84 (17.2%)		
Grado histológico			
• G1	171 (35.1%)	111 (46.3%)	60 (24.3%)
• G2	280 (57.5%)	114 (47.5%)	166 (67.2%)
• G3	35 (7.2%)	15 (6.3%)	20 (8.1%)
• ND	1 (0.2%)	-	1 (0.4%)
Invasión vascular			
• Si	20 (4.1%)	-	20 (8.1%)
• No	467 (95.9%)	240 (100%)	227 (91.9%)
Invasión perineural			
• Sí	1 (0.2%)	-	1 (0.4%)
• No	486 (99.8%)	240 (100%)	246 (99.6%)
Inestabilidad de microsatélites			
• Sí	14 (2.9%)	11 (4.6%)	3 (1.2%)
• No	23 (4.7%)	5 (2.1%)	18 (7.3%)
• ND	450 (93.8%)	224 (93.3%)	226 (91.5%)
Src máximo			
• 0	144 (29.6%)	88 (36.7%)	56 (22.7%)
• 1	118 (24.2%)	54 (22.5%)	64 (25.9%)
• 2	103 (21.1%)	34 (14.2%)	69 (27.9%)
• 3	44 (9.0%)	17 (7.1%)	27 (10.9%)
• ND	78 (16.0%)	47 (19.6%)	31 (12.6%)

G; Grado histológico. ND: No determinado.

1.3. Asociación entre la expresión de pSrc y las características clinicopatológicas

La asociación entre la expresión de pSrc y las diversas características clinicopatológicas de interés se recoge en la Tabla 8. Se observó una tendencia a una mayor expresión de pSrc en pacientes de mayor edad (8.8% vs 12.6% en ≤ 65 vs $>$ de 65 años, respectivamente), en pacientes que debutaron con obstrucción intestinal (15.1% vs 10.1% en sí vs no, respectivamente), en tumores localizados en colon derecho (14.4% vs 8.9% en colon derecho vs colon izquierdo, respectivamente), en tumores con invasión vascular (16.7% vs 10.7% en sí vs no, respectivamente) y en estadios más avanzados de la enfermedad (12.5% vs 8.8% en estadio III vs II, respectivamente). Todos estos factores se asocian, en general, a un peor pronóstico. No obstante, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. Por último, también se observó una mayor expresión de pSrc en pacientes recidivados o fallecidos.

Tabla 8. Características clínico-patológicas en función de la expresión tumoral de pSrc de la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

	N	Src		P
		0-2	3	χ^2
Sexo				NS
• Varón	230	207 (90.0%)	23 (10.0%)	
• Mujer	179	158 (88.3%)	21 (11.7%)	
Edad				NS
• ≤ 65	171	156 (91.2%)	15 (8.8%)	
• > 65	238	209 (87.8%)	29 (12.2%)	
ECOG				NS
• 0-1	297	267 (89.9%)	30 (10.1%)	
• ≥ 2	28	25 (89.3%)	3 (10.7%)	
CEA				NS
• Normal	100	93 (93.0%)	7 (7.0%)	
• Elevado	125	116 (92.8%)	9 (7.2%)	
Localización tumoral				NS
• Colon derecho	139	119 (85.6%)	20 (14.4%)	
• Colon izquierdo	270	246 (91.1%)	24 (8.9%)	
Obstrucción intestinal				NS
• Sí	73	62 (84.9%)	11 (15.1%)	
• No	336	302 (89.9%)	34 (10.1%)	
Perforación intestinal				NS
• Sí	30	27 (90.0%)	3 (10.0%)	
• No	379	337 (88.9%)	42 (11.1%)	
Histología				NS
• Adenocarcinoma	392	351 (89.5%)	41 (10.5%)	
• Mucinoso/células en Anillo de sello/medular	17	14 (82.4%)	3 (17.6%)	
Invasión vascular				NS
• Sí	18	15 (83.3%)	3 (16.7%)	
• No	391	350 (89.5%)	41 (10.5%)	
T				NS
• pT1-2	15	14 (93.3%)	1 (6.7%)	
• pT3-4	393	350 (89.1%)	43 (10.9%)	
N				NS
• pN0	193	176 (91.2%)	17 (8.8%)	
• pN1/2	216	189 (87.5%)	27 (12.5%)	
Grado histológico				NS
• G1	140	102 (72.9%)	38 (27.1%)	
• G2	237	137 (57.8%)	100 (42.2%)	
• G3	31	29 (93.5%)	2 (6.5%)	
Estadío tumoral				NS
• II	193	176 (91.2%)	17 (8.8%)	
• III	216	189 (87.5%)	27 (12.5%)	
QT adyuvante				NS
• Sí	255	233 (91.4%)	22 (8.6%)	
• No	154	132 (85.7%)	22 (14.3%)	
Recaída				NS
• Sí	117	100 (85.5%)	17 (14.5%)	
• No	292	264 (90.4%)	28 (9.6%)	
Éxito				NS
• Sí	141	119 (84.4%)	22 (15.6%)	
• No	268	245 (91.4%)	23 (8.6%)	

CEA: Antígeno carcinoembrionario. G: Grado histológico. QT: Quimioterapia. NS: No significativo.

1.4. Supervivencia en función de las características clinicopatológicas

Con una mediana de seguimiento de 66 meses (rango 0-169), el 28% de los pacientes habían recidivado y el 36% habían fallecido en el momento del análisis (Tabla 9).

La SLE a los 5 años para la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III fue del 60.6% (95% IC 56-65.2). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la tasa de SLE a 5 años en función del sexo (55.7% en varones, 67.2% en mujeres), edad (66.1% en ≤ 65 , 56.5% en > 65 años), estadio TNM (67.5% en estadio II, 54.2% en estadio III), valor prequirúrgico de CEA (71.9% si normal, 59.1% si elevado, 55.2% si ND), ECOG (65.8% ECOG 0-1, 27.3% ECOG ≥ 2), presencia de perforación intestinal (62.3% si tumor no perforado, 36.4% si perforado) y afectación ganglionar (67.1% si N0, 58.4% si N1 y 47.3% si N2).

La SG a los 5 años para la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III fue del 71.6% (95% IC 67.2-76). En este caso, las variables que demostraron tener un impacto significativo fueron: sexo (66.4% en varones, 78.7% en mujeres), edad (79.0% en pacientes ≤ 65 , 66.0% en > 65 años), estadio TNM (77.0% en estadio II, 66.6% en estadio III), valor prequirúrgico de CEA (82.5% si normal, 70.7% si elevado, 66.0% si ND), ECOG (77.5% ECOG 0-1, 41.6% ECOG ≥ 2), presencia de perforación intestinal (71.9% si no perforado, 52.9% si perforado) y de obstrucción intestinal (73.9% si no obstrucción, 60.6% si obstrucción).

Tabla 9. Supervivencia libre de progresión y supervivencia global en función de las características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

		N (%)	SLE (% a 5a)	P	SG (% a 5a)	P
Total Población		487	60.6%		71.6%	
Sexo	Varón	277	55.7%	0.01	66.4%	0.01
	Mujer	210	67.2%		78.7%	
Edad	≤ 65 años	201	66.1%	0.01	79.0%	0.05
	> 65 años	286	56.5%		66.0%	
ECOG al dx	0-1	361	65.8%	0.00	77.5%	<0.01
	≥ 2	32	27.3%		41.6%	
CEA pre-cirugía	Normal	118	71.9%	0.02	82.5%	0.01
	Elevado	150	59.1%		70.7%	
	ND	219	55.2%		66.0%	
Localización tumoral	Colon derecho	164	55.6%	NS	66.4%	0.12
	Otros	323	63.1%		74.3%	
Obstrucción intestinal	Sí	86	51.1%	0.10	60.6%	<0.01
	No	401	62.5%		73.9%	
Perforación intestinal	Sí	36	36.4%	0.04	52.9%	<0.01
	No	451	62.3%		71.9%	
Invasión vascular	Sí	20	52.9%	NS	59.5%	NS
	No	467	61.0%		72.1%	
T	pT1	2	50.0%	NS	50.0%	NS
	pT2	16	65.6%		81.3%	
	pT3	366	63.2%		73.8%	
	pT4	102	51.0%		63.2%	
N	pN0	240	67.1%	0.05	77.0%	NS
	pN1	162	58.4%		68.0%	
	pN2	85	47.3%		63.8%	
Grado histológico	G1	171	69.7%	0.10	79.3%	NS
	G2	280	55.3%		59.0%	
	G3	35	61.6%		73.5%	
Estadio	II	240	67.5%	0.05	77.0%	0.02
	III	247	54.2%		66.6%	
QT adyuvante	No	189	59.5%	NS	66.4%	NS
	Sí	298	63.2%		74.5%	
	- FP	185	63.2%	NS	75.4%	NS
	- FP + Ox	113	58.5%		72.9%	

SLE: Supervivencia libre de enfermedad. SG: Supervivencia global. dx: diagnóstico. CEA: Antígeno carcinoembrionario. G: Grado histológico. ND: No determinado. FP: Fluoropirimidinas. Ox: Oxaliplatino. NS: No significativo.

1.5. Impacto de la expresión de pSrc en la supervivencia

La sobre-expresión de pSrc se asoció con un peor pronóstico en términos de SLE y SG (Tabla 10).

La tasa de SLE a 5 años fue significativamente inferior para pacientes con alta expresión de pSrc (+3) en comparación con aquellos con una expresión 0-2 (39.2% vs 63.3%, respectivamente, $HR=0.56$; $p=0.005$) (Figura 6).

Si se analiza de manera individualizada la SLE a 5 años fue muy similar en cada subgrupo de expresión baja de pSrc: 62.7% si expresión nula (0), 63.1% si expresión débil (+1), 63.8% si expresión moderada (2+) y 60.3% en los pacientes con pSrc no determinado, aunque con mayor seguimiento los pacientes con expresión nula de pSrc parecen tener mejor pronóstico que los pacientes con expresión 1-2 (Figura 7).

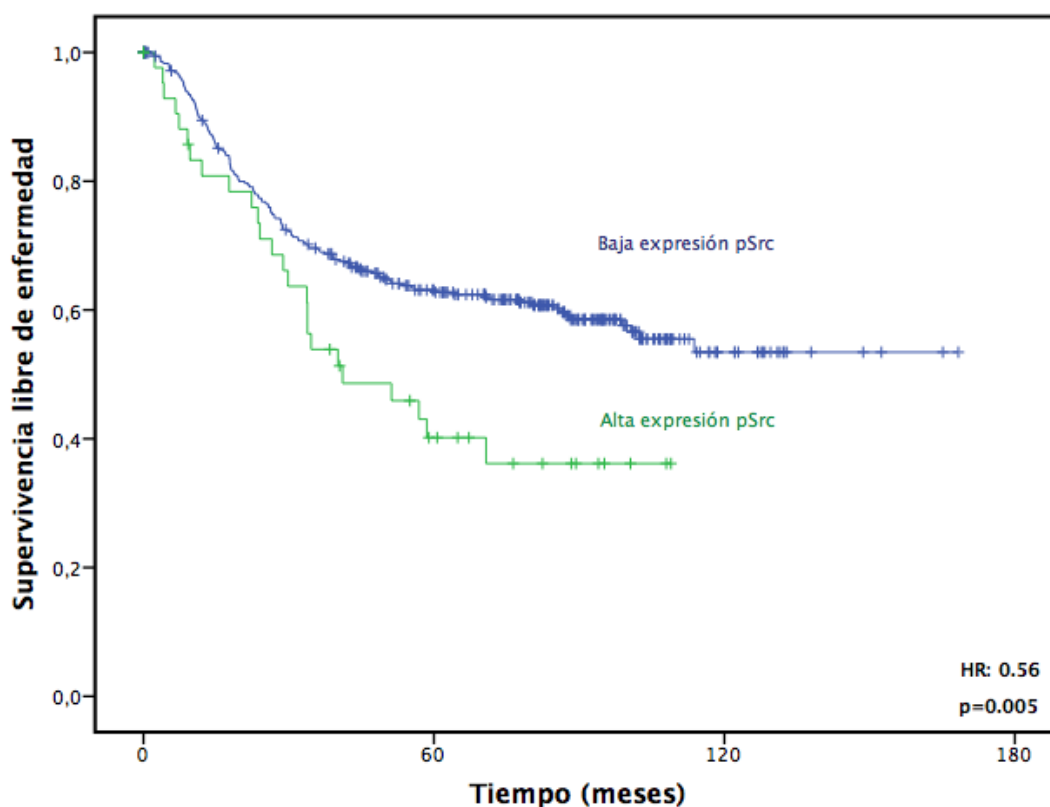


Figura 6. Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión tumoral de pSrc agrupada (0-2 vs 3) en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

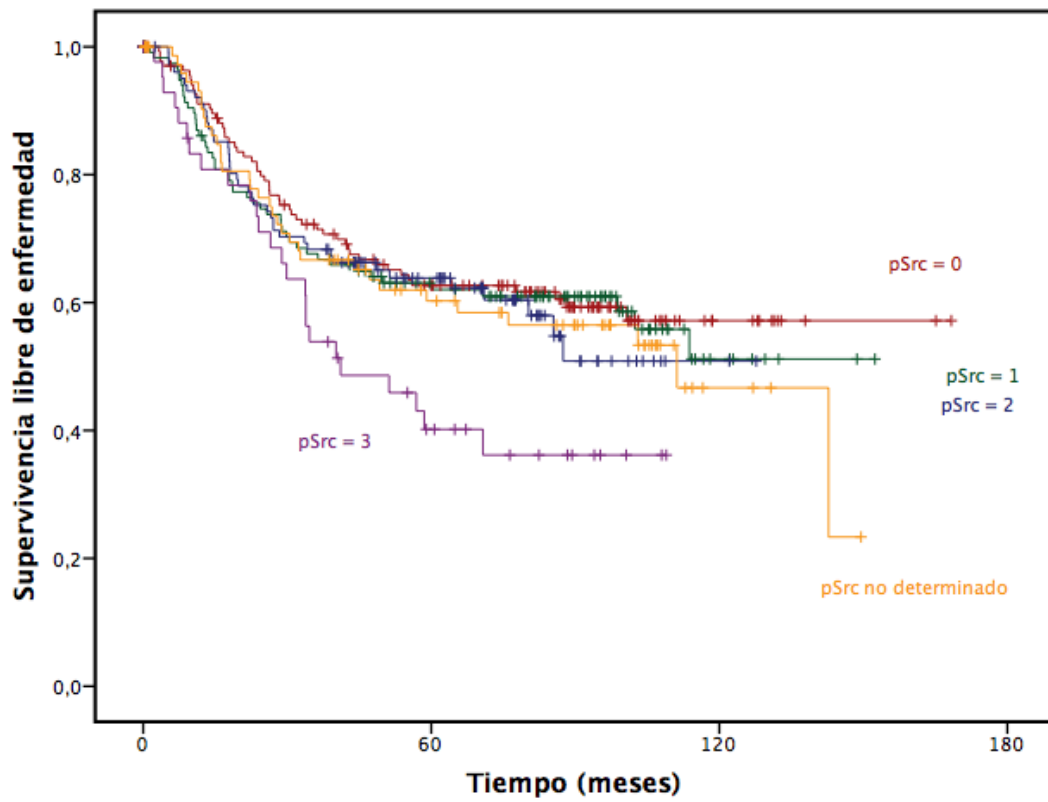


Figura 7. Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión tumoral de pSrc en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

Asimismo, se observó que la alta expresión de pSrc se asoció de manera significativa a la tasa de SG a 5 años (57.5% vs 74.2% en pacientes con expresión de pSrc alta (+3) vs baja (0-2), $HR=0.55$; $p=0.02$) (Figura 8). En este caso también se observó una tasa de SG a 5 años muy similar en los distintos subgrupos con expresión baja de pSrc: 75.3% si no existía expresión de pSrc, 74.4% si nivel de expresión 1, 72.6% si nivel de expresión 2, y 67.2% en los casos no determinados (Figura 9).

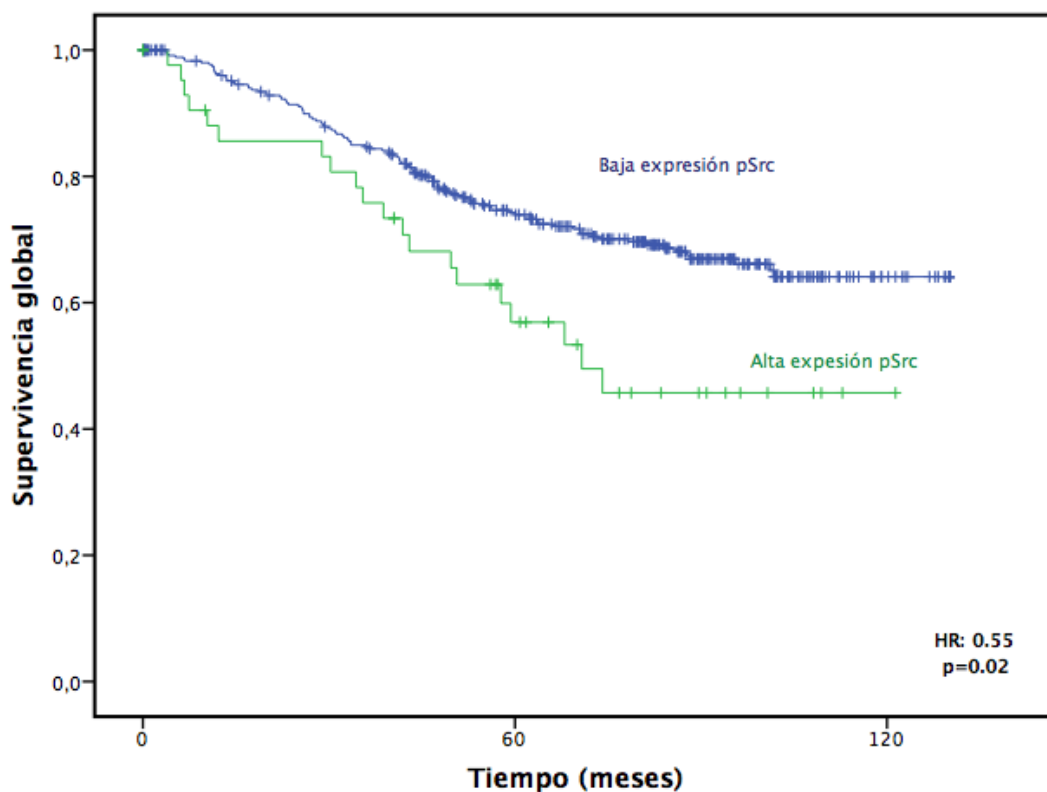


Figura 8. Supervivencia global en función de la expresión tumoral de pSrc agrupada (0-2 vs 3) en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

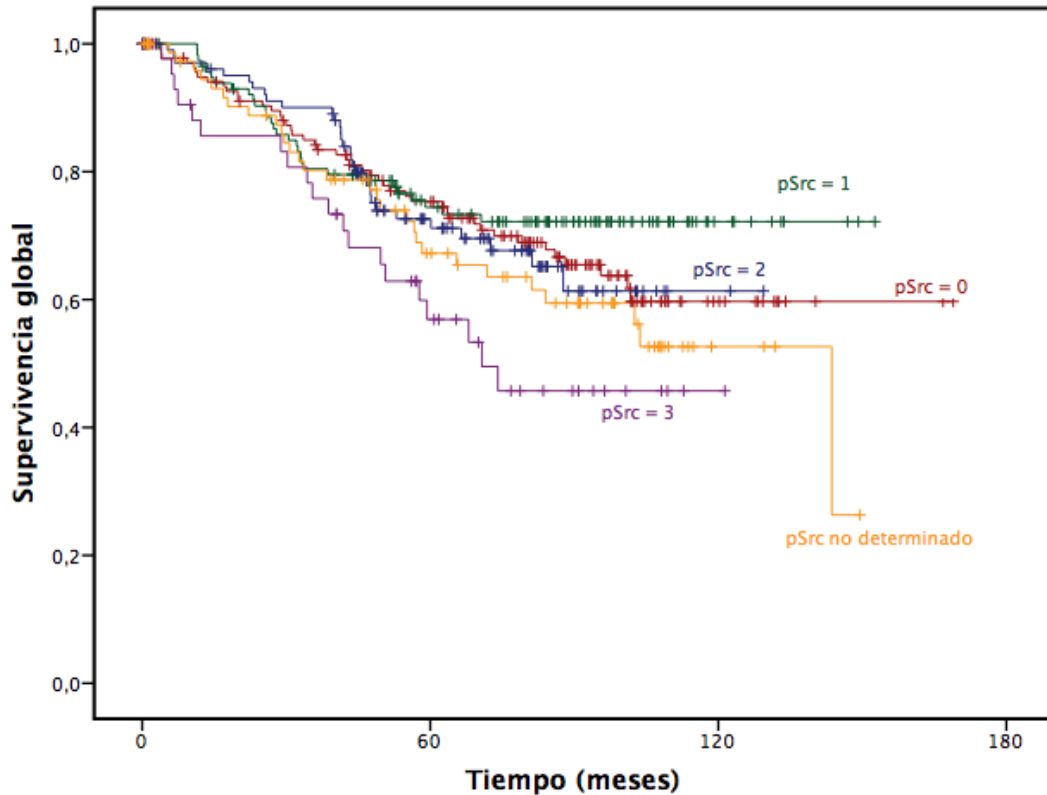


Figura 9. Supervivencia global en función de la expresión tumoral de pSrc en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

En análisis exploratorios por subgrupos se observó que una alta expresión de pSrc tenía un impacto particularmente negativo en la supervivencia en pacientes con estadio II, varones y en tumores de colon izquierdo (Tabla 10).

Específicamente en el estadio II, la tasa de SLE a 5 años fue del 70% en pacientes con baja expresión vs 28% en alta expresión ($HR=0.36$; $p=0.001$) (Figura 10). Adicionalmente, la tasa de SG a los 5 años para estos pacientes fue del 81% vs 54% en baja vs alta expresión, respectivamente ($HR=0.43$; $p=0.03$) (Figura 11).

Tabla 10. Análisis de supervivencia en función de la expresión tumoral de pSrc en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

	N	SLE (% a 5 años)				SG (% a 5 años)			
		Src		HR	P	Src		HR	P
		0-2	3			0-2	3		
Todos los pacientes	487	63.3%	39.2%	0.56	0.005	74.2%	57.5%	0.55	0.02
Estadíos									
Estadio II	240	70.4%	28.1%	0.36	0.001	81.2%	54.4%	0.43	0.03
Estadio III	247	56.9%	43.7%	0.75	0.31	67.8%	58.4%	0.66	0.18
QT adyuvante									
No	189	63.7%	35.4%	0.49	0.02	69.1%	56.5%	0.61	0.16
Sí	298	63.1%	42.4%	0.63	0.11	76.8%	58.3%	0.54	0.07
❖ FP	185	66.1%	35.7%	0.50	0.05	79.1%	54.4%	0.46	0.05
❖ FP+OX	113	58.4%	55.6%	0.91	0.85	72.6%	64.8%	0.75	0.63
Sexo									
Hombre	277	58.4%	29.3%	0.52	0.02	69.5%	45.7%	0.51	0.02
Mujer	210	69.7%	51.7%	0.58	0.11	80.5%	73.0%	0.60	0.21
Localización TP									
Colon derecho	164	56.0%	55.0%	1.00	0.98	66.5%	73.8%	1.56	0.34
Colon izquierdo	323	66.7%	27.5%	0.38	<0.001	77.8%	43.9%	0.29	<0.001

SLE: Supervivencia libre de enfermedad. SG: Supervivencia global. QT: Quimioterapia. FP: Fluoropirimidinas. Ox: Oxaliplatino. TP: Tumor primario.

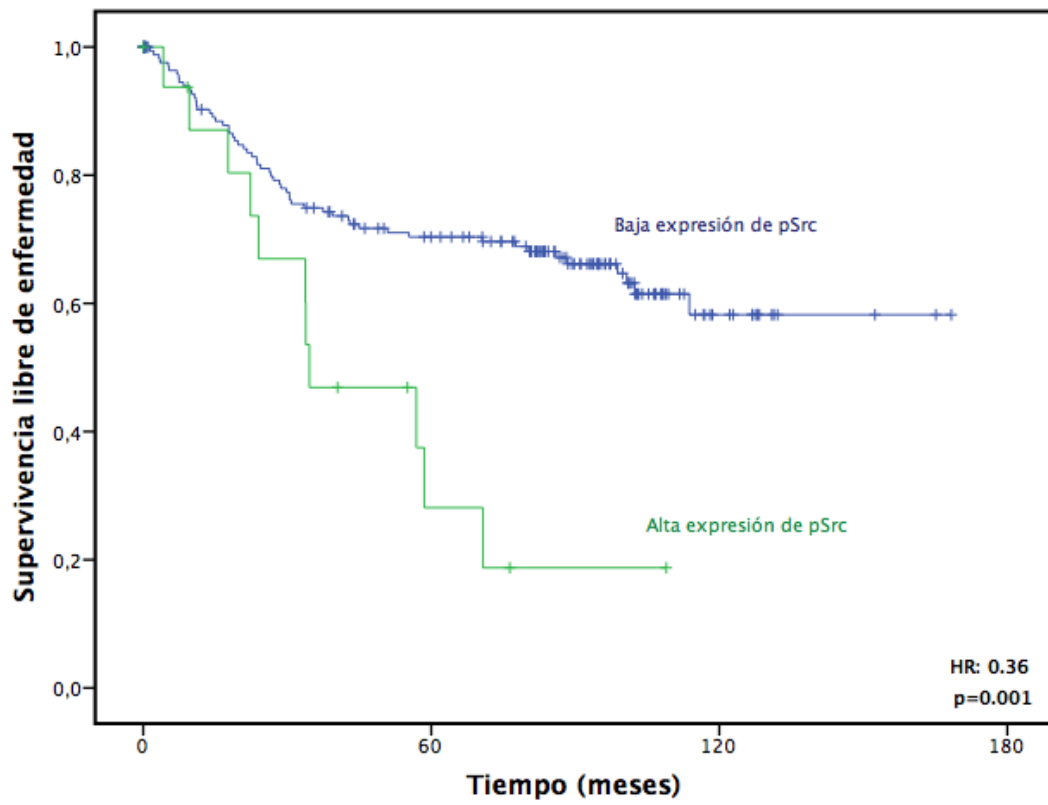


Figura 10. Impacto de la expresión de pSrc en la supervivencia libre de enfermedad en el subgrupo de pacientes con CCR estadio II.

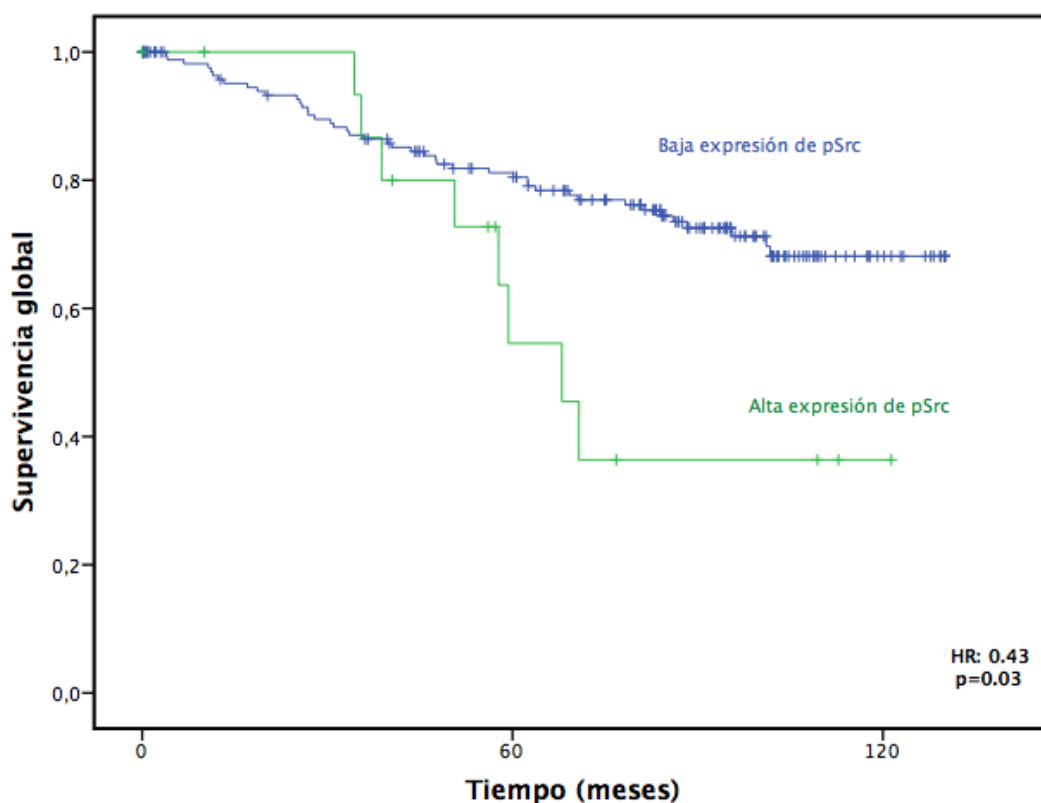


Figura 11. Impacto de la expresión de pSrc en la supervivencia global en el subgrupo de pacientes con CCR estadio II.

Para valorar el papel pronóstico de la expresión de pSrc en la supervivencia con independencia de otras características clínico-patológicas, se realizó el análisis de regresión multivariante de Cox incluyendo las variables previamente descritas en la sección “Material y Métodos” (edad, sexo, ECOG, valor de CEA prequirúrgico, cuadro obstructivo como debut de la enfermedad, perforación intestinal al diagnóstico, administración de QT adyuvante y grado de intensidad de la expresión de pSrc). Los resultados de dicho análisis confirmaron que una alta expresión de pSrc se asocia de forma independiente con un peor pronóstico, tanto en términos de SLE ($HR=0.56$, $p = 0.02$) como de SG ($HR=0.58$, $p =0.06$). El ECOG y la perforación intestinal también resultaron ser factores pronósticos significativos para la SLE en el análisis multivariante. Además, el sexo, el ECOG, la obstrucción y perforación intestinal fueron factores pronósticos significativos para SG (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis multivariante de factores pronósticos de SLE y SG en la cohorte de pacientes con CCR estadio II-III.

Factores	SLE		SG	
	HR	P	HR	P
Edad (≤ 65 vs >65 años)	0.94	0.75	0.74	0.17
Sexo (V vs M)	1.66	0.08	1.57	0.04
ECOG		0.04		0.04
• ECOG 0 vs 1	1.08	0.72	0.88	0.64
• ECOG 0 vs 2	2.32	0.00	2.46	0.01
• ECOG 0 vs 3	1.21	0.74	1.31	0.63
CEA		0.10		0.10
• CEA elevado vs normal	1.54	0.12	1.56	0.17
• CEA ND vs normal	1.75	0.03	1.94	0.03
Obstrucción (no vs sí)	0.73	0.17	0.51	0.01
Perforación (no vs sí)	0.43	0.01	0.37	0.01
Estadío TNM (II vs III)	0.68	0.07	0.63	0.06
QT adyuvante (no vs sí)	1.09	0.71	1.51	0.08
pSrc (bajo vs alto)	0.56	0.02	0.58	0.06

SLE: Supervivencia libre de enfermedad. SG: Supervivencia global. V: Varón. M: Mujer. CEA: Antígeno carcinoembrionario. ND: No determinado.

1.6. Expresión de pSrc y sensibilidad a quimioterapia

Finalmente, para valorar el posible papel de pSrc como factor predictivo de resistencia a oxaliplatino, se analizó el impacto de la expresión de pSrc en función del tratamiento adyuvante recibido (no QT, fluoropirimidinas en monoterapia, o fluoropirimidinas en combinación con oxaliplatino). Así, se observó que pSrc tenía un impacto negativo en la SLE que fue estadísticamente significativo tanto en pacientes que no recibieron QT (63.7% vs 35.4% en pacientes con baja vs alta expresión de pSrc, $HR=0.49$, $p=0.02$) como en aquellos que recibieron QT adyuvante con FP (66.1% vs 35.7% en pacientes con baja vs alta expresión de pSrc, $HR=0.50$, $p=0.05$). Por tanto, pSrc tiene un impacto negativo en la evolución de la enfermedad con independencia del tratamiento recibido (Figura 12). Tanto para SLE como para SG, no se observó una interacción significativa entre el biomarcador y el tratamiento con quimioterapia (test de interacción $P = 0.78$ para SLE y 0.86 para SG).

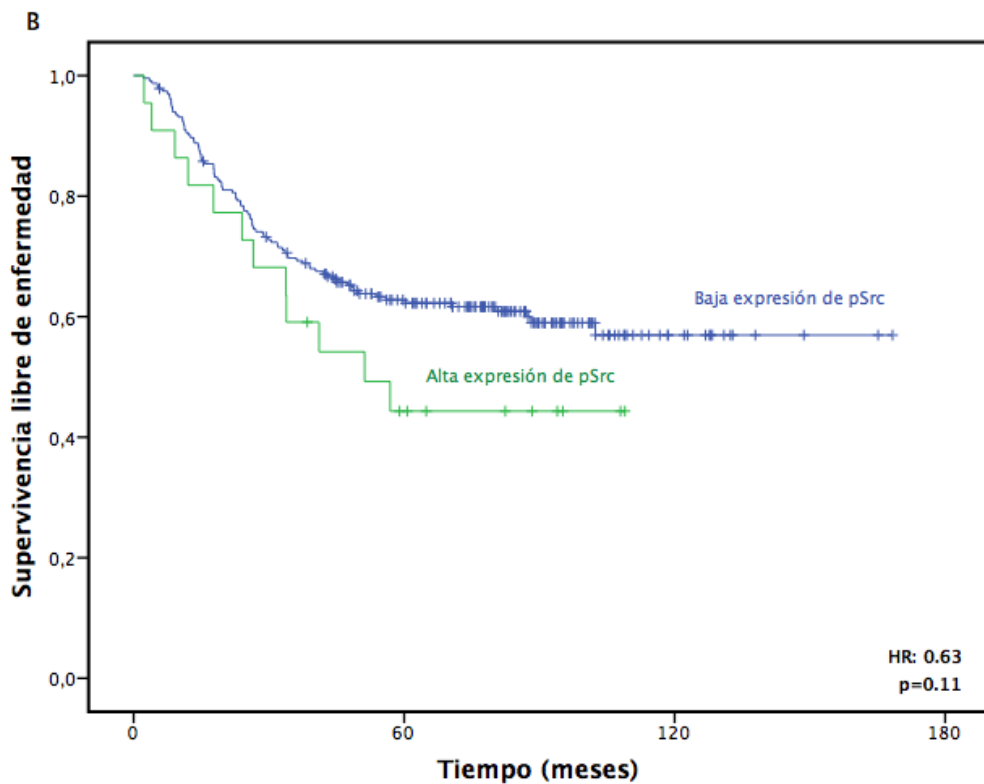
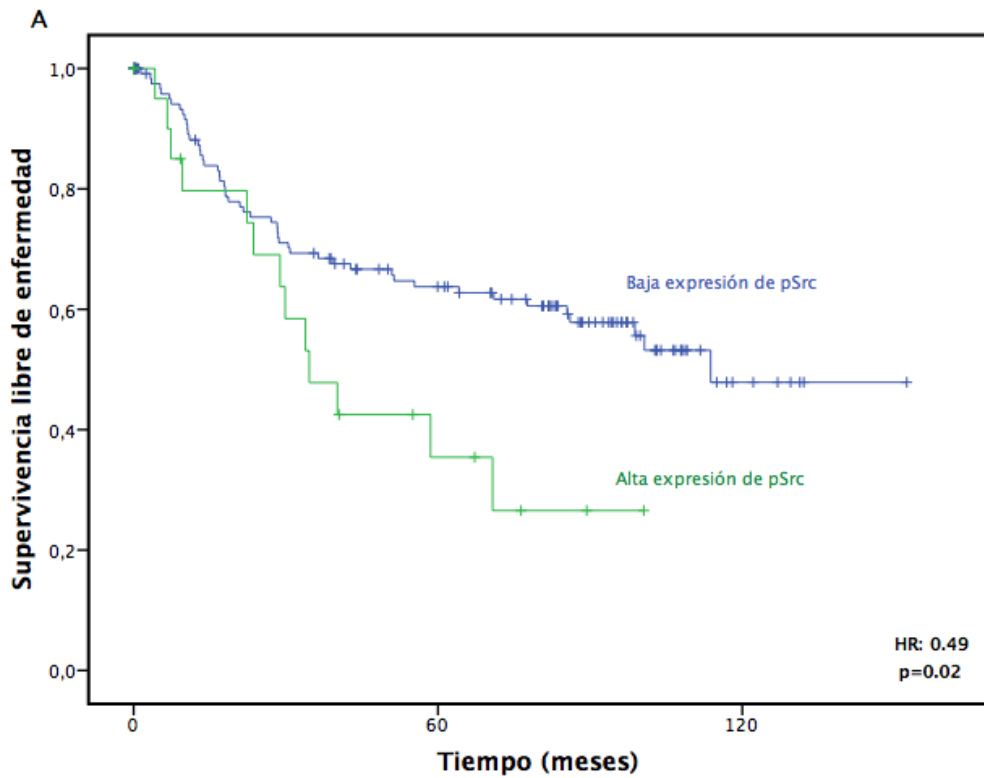


Figura 12. Impacto de la expresión de pSrc en la supervivencia libre de enfermedad en función de la QT recibida. **A:** pacientes que no recibieron QT adyuvante. **B:** pacientes que recibieron QT adyuvante (FP \pm oxaliplatino).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Src es un receptor tirosina quinasa citoplasmático que actúa como regulador de diversos procesos relacionados con la carcinogénesis. La activación de Src se asocia a un fenotipo tumoral más agresivo. En modelos preclínicos la activación de Src induce quimiorresistencia que puede revertirse farmacológicamente con inhibidores específicos de Src.
- pSrc se expresa en aproximadamente un 54% de los pacientes con CCR estadio II y III (en un 9% de los casos la expresión es alta (+3)) y en un 53% de los pacientes con CCR estadio IV (en un 5% de los casos la expresión es alta (+3)).
- La alta expresión de Src activado o pSrc (+3) confiere un peor pronóstico a los pacientes con CCR localizado en términos de SLE y SG, independientemente del tratamiento adyuvante recibido y de otros factores clínico-patológicos de conocida relevancia pronóstica para este tumor.
- La expresión de pSrc (1-3) se asocia en CCRm con una tendencia a una menor TRO y peor pronóstico tanto en términos de SLP como de SG.
- En nuestro estudio hemos identificado pSrc como un nuevo biomarcador pronóstico en CCR, que permite identificar un subgrupo de pacientes con peor supervivencia potencialmente tributarios de nuevas estrategias terapéuticas, ya que Src es una tirosina quinasa susceptible de inhibición farmacológica.
- En nuestro estudio no se ha confirmado la sobre-expresión de pSrc como factor predictivo de resistencia a QT basada en oxaliplatino en CCR estadios II-IV.

ANEXO: PUBLICACIONES

ANEXO: PUBLICACIONES

1. **Julia Martínez-Pérez**, Iker López-Calderero, Carmen Sáez, Marta Benavent, María Luisa Limón, Reyes González-Expósito, Beatriz Soldevilla, María Carmen Riesco-Martínez, Amancio Carnero, Rocío García-Carbonero. Prognostic relevance of Src activation in stage II-III colon cancer. *Human Pathol.* 2017;67:119-125. **IF 2.791. Q2**
2. **Julia Martínez-Pérez**, María C. Riesco-Martínez, Rocío García-Carbonero. The safety of trifluridine and tipiracil for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Expert Opin Drug Saf.* 2018; 17(6): 643-50. **IF 3.439. Q1**
3. Purificación Estévez-García, Fernando Rivera, Sonia Molina-Pinelo, Marta Benavent, Javier Gómez, María Luisa Limón, María Dolores Pastor, **Julia Martínez Pérez**, Luis Paz-Ares, Amancio Carnero, Rocío García-Carbonero. Gene expression profile predictive of response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015; 6(8): 6151-6159. **IF 6.636. Q1**

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Allgayer H, Boyd DD, Heiss MM, Abdalla EK, Curley SA, Gallick GE. Activation of Src kinase in primary colorectal carcinoma: an indicator of poor clinical prognosis. *Cancer*. 2002; 94(2): 344–51.
- André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350(23): 2343-51.
- Arcaroli J, Touban BM, Tan AC, Varella-Garcia M, Powell RW, Eckhardt SG, et al. Gene Array and Fluorescence In situ Hybridization Biomarkers of Activity of Saracatinib (AZD0530), a Src Inhibitor, in a Preclinical Model of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 4165-77.
- Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol*. 2017; 28(8): 1713-29.
- Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2013; 3(6): 658-73.
- Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cogen AM, Figueredo AT, Flynn P, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22(16): 3408-19.
- Best L, Simmonds P, Baughan C, Buchanan R, Davis C, Fentiman I, et al. Collaboration Colorectal Meta-analysis. Palliative chemotherapy for advanced or metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2): CD001545.
- Campbell EJ, McDuff E, Tatarov O, Tovey S, Brunton V, Cooke TG, Edwards J. Phosphorylated c-Src in the nucleus is associated with improved patient outcome in ER-positive breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2008; 99: 1769-74.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487(7407): 330-7.

- Chatzizacharias NA, Kouraklis GP, Giaginis CT, Theocharis ST. Clinical Significance of Src Expression and Activity in Human Neoplasia. *Histol Histopathol.* 2012; 27(6): 677-92.
- Chau I, Norman AR, Cunningham D, Tait D, Ross PJ, Iveson T, et al. A randomised comparison between 6 months of bolus fluorouracil/leucovorin and 12 weeks of protracted venous infusion fluorouracil as adjuvant treatment in colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2005; 16(4): 549-57.
- Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(8): 16365-85.
- Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol.* 2015;16:1306–15.
- Cremolini C, Shirripa M, Antoniotti C, Moretto R, Salvatore L, Masi G, et al. First-line chemotherapy for mCRC—a review and evidence-based algorithm. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015; 12(10): 607-19.
- D'Arrigo A, Belluco C, Ambrosi A, Digito M, Esposito G, Bertola A, et al. Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 2005; 115(2): 256-62.
- Dalerba P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, et al. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2016; 374 (3): 211-22.
- De Sousa EM, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med.* 2013; 19(5): 614-8.
- Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing Colon Cancer Adjuvant Therapy: Selecting Optimal Treatments for Individual Patients. *J Clin Oncol.* 2015; 33(16): 1787-96.
- Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017; 17(2): 79-92.
- Dunn EF, Iida M, Myers RA, Hintz KA, Campbell DA, Armstrong EA, et al. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab.

Oncogene. 2011; 30(5): 561–74.

- Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. Inhibition of SRC tyrosine kinase impairs inherent and acquired gemcitabine resistance in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(7): 2307-18.
- Edge SB, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010 ;(6): 1471-4.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent RF, Dancey J. New response evaluation criteria in solid tumors: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer.* 2009; 45(2): 228-47.
- Elsberger B, Fullerton R, Zino S, Jordan F, Mitchell TJ, Brunton VG, et al. Breast cancer patients' clinical outcome measures are associated with Src kinase family member expression. *Br J Cancer.* 2010; 103(6):899–909.
- Elsberger B, Tan BA, Mitchell TJ, Brown SBF, Mallon EA, Tovey SM, et al. Is expression or activation of Src kinase associated with cancerspecific survival in ER-, PR- and HER2-negative breast cancer patients? *Am. J. Pathol.* 2009; 175(4): 1389-97.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61(5): 759-67.
- Ferlay, J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015; 136(5): 359–86.
- Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1602(2): 114–30.
- García-Alfonso P, García-Foncillas J, Salazar R, Pérez-Segura P, García-Carbonero R, Musulén-Palet E, et al. Updated guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma: a national consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol.* 2015; 17(4):264-73.
- Gargalionis AN, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. The molecular rationale of Src inhibition in colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 2014; 134(9): 2019-29.
- Gray RG, Quirke P, Handley K, Lopatin M, Magill L, Baehner FL, et al.

Validation Study of a Quantitative Multigene Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction Assay for Assessment of Recurrence Risk in Patients With Stage II Colon Cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29(35): 4611-19.

- Griffiths GJ, Koh MY, Brunton VG, Cawthorne C, Reeves NA, Greaves M, et al. Expression of kinase-defective mutants of c-Src in human metastatic colon cancer cells decreases Bcl-xL and increases oxaliplatin- and Fas-induced apoptosis. *J Bio Chem.* 2004; 279(44): 46113-121.
- Grothey A, Sargent D. Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line. *J Clin Oncol.* 2005; 23(36): 9441-2.
- Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2018; 378(13): 1177-88.
- Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015; 21(11): 1350-6.
- Guo Q, Lu L, Liao Y, Wang X, Zhang Y, Liu Y, et al. Influence of c-Src on hypoxic resistance to paclitaxel in human ovarian cancer cells and reversal of FV-429. *Cell Death Dis.* 2018; 8(1): e3178.
- Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, O'Rourke MA, Frontiera MS, Jackson DV, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol.* 2005; 23(34): 8671-8.
- Haller DG, O'Connell MJ, Cartwright TH, Twelves CJ, McKenna EF, Sun W, et al. Impact of age and medical comorbidity on adjuvant treatment outcomes for stage III colon cancer: a pooled analysis of individual patient data from four randomized, controlled trials. *Ann Oncol.* 2015; 26(4): 715–24.
- Haller DG, Tabernero J, Maroun J, Braud F, Price T, Cutsem EV, et al. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil and Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29(11): 1465-71.
- Heer P, Koudijs MM, Van de Velde CJ, Aalbers RI, Tollenaar RA, Putter H, et al. Combined expression of the non-receptor protein tyrosine kinases

FAK and Src in primary colorectal cancer is associated with tumor recurrence and metastasis formation. *Eur J Surg Oncol.* 2008; 34(11): 1253-61.

- Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer.* 2017; 70: 87-98.
- Huang F, Reeves K, Han X, Fairchild C, Platero S, Wong TW, et al. Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer Res.* 2007; 67(5): 2226-38.
- Hutchins G, Southward K, Handley K, Magil L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29(10): 1261-70.
- Kim L, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009; 6(10): 587–95.
- Kopetz S, Lesslie D, Dallas N, Park SI, Johnson M, Parikh NU, et al. Synergistic Activity of the Src Family Kinase Inhibitor Dasatinib and Oxaliplatin in Colon Carcinoma Cells Is Mediated by Oxidative Stress. *Cancer Res.* 2009; 69: 3842-49.
- Kopetz S, Tabernero J, Rosenberg R, Jiang ZQ, Moreno V, Bachleitner-Hofmann T, et al. Genomic Classifier ColoPrint Predicts Recurrence in Stage II Colorectal Cancer Patients More Accurately Than Clinical Factors. *Oncologist.* 2015; 20(2): 127-33.
- Kuebler JP, Wieand SH, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, et al. Oxaliplatin Combined With Weekly Bolus Fluorouracil and Leucovorin As Surgical Adjuvant Chemotherapy for Stage II and III Colon Cancer: Results From NSABP C-07. *J Clin Oncol.* 2007; 25(16): 2198-204.
- Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015; 372 (26): 2509-20.
- Le XF, Bast RC. Src family kinases and paclitaxel sensitivity. *Cancer Biol Ther.* 2011; 12(4): 260-69.
- Leroy C, Fialin C, Sirvent A, Simon V, Urbach S, Poncet J, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals a cluster of tyrosine kinases that

mediates Src invasive activity in advanced colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2009; 69: 2279–86.

- Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural Invasion Is an Independent Predictor of Outcome in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27(31): 5131–37.
- Lieu CH, Wolff RA, Eng C, Overman MJ, Henry L, Coulson R, et al. Phase IB study of the Src inhibitor dasatinib with FOLFOX and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 3536.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 251364.
- Maak M, Simon I, Nitsche U, Roepman P, Snel M, Glas AM, et al. Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. *Ann Surg.* 2013; 257(6): 1053-8.
- Masaki T, Igarashi K, Tokuda M, Yukimasa S, Han F, Jin J, et al. pp60c-src activation in lung adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer.* 2003; 39(10): 1447-55.
- Mazurenko NN, Kogan EA, Zborovskaya IB, Kissel'jov FL. Expression of pp60c-src in human small cell and non-small cell lung carcinomas. *Eur. J. Cancer.* 1992; 28(2-3): 372-77.
- Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, Di Narzo AF, Soneson C, Budinska E, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol.* 2014; 25: 1995–2001.
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med.* 1990; 322(6): 352-8.
- Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, Berg KD, et al. Comparison of the Microsatellite Instability Analysis System and the Bethesda Panel for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancers. *J Mol Diagn.* 2006; 8(3): 305-11.
- Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982 Dec;5(6):649-55.
- Ou B, Zhao J, Guan S, Wangpu X, Zhu C, Zong Y, et al. Plk2 promotes tumor growth and inhibits apoptosis by targeting Fbxw7/Cyclin E in

colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2016; 380(2): 457-66.

- Parseghian CM, Parikh NU, Wu JY, Jiang ZQ, Henderson L, Tian F, et al. Dual Inhibition of EGFR and c-Src by Cetuximab and Dasatinib Combined with FOLFOX Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(15): 4146-54.
- Patel A, Sabbineni H, Clarke A, Somanath PR. Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sci.* 2016; 157: 52–61.
- Peiró G, Ortiz-Martínez F, Gallardo A, Pérez-Balaguer A, Sánchez-Payá J, Ponce J, et al. Src, a potential target for overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma. *Br J Cancer.* 2014; 327: 1-7.
- Pengetnze Y, Steed, M, Roby KF, Terranova PF, Taylor CC. Src tyrosine kinase promotes survival and resistance to chemotherapeutics in a mouse ovarian cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 309: 377-83.
- Perez M, Lucena-Cacace A, Marín-Gómez LM, Padillo-Ruiz J, Robles-Frias MJ, Saez C, et al. Dasatinib, a Src inhibitor, sensitizes liver metastatic colorectal carcinoma to oxaliplatin in tumors with high levels of phospho-Src. *Oncotarget.* 2016; 7(22): 33111–124.
- Petitprez A, Larsen AK. Irinotecan Resistance is Accompanied by Upregulation of EGFR and Src Signaling in Human Cancer Models. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19(5): 958-64.
- Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer. A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2016; 3(2): 211-19.
- Reddy SM, Kopetz S, Morris J, Parikh N, Qiao W, Overman MJ, et al. Phase II study of saracatinib (AZD0530) in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs.* 2015; 33(4): 977-84.
- Roskoski R. Src protein–tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 324(4): 1155-64.
- Roth AD, Delorenzi M, Tejpar S, Yan P, Klingbiel D, Fiocca R, et al. Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104(21): 1635-46.

- Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med.* 2013; 19(5): 619-25.
- Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29(1): 17-24.
- Sanoff HK, Carpenter WR, Stürmer T, Goldberg RM, Martin CF, Fine JP, et al. Effect of adjuvant chemotherapy on survival of patients with stage III colon cancer diagnosed after age 75 years. *J Clin Oncol.* 2012; 30(21): 2624-34.
- Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buyse M, Andre T, et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol.* 2009; 27(6): 872-7.
- Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton R, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(20): 3219-26.
- Schrag D, Weng S, Brooks G, Meyerhardt JA, Venook AP. The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2016; 34: 3505.
- Serrels A, Macpherson IR, Evans TR, Lee FY, Clark EA, Sansom OJ, et al. Identification of potential biomarkers for measuring inhibition of Src kinase activity in colon cancer cells following treatment with dasatinib. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(12): 3014-22.
- Sharma MR, Wroblewski K, Polite BN, Knost JA, Wallace JA, Modi S, et al. Dasatinib in previously treated metastatic colorectal cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Invest New Drugs.* 2012; 30: 1211-15.
- Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal Cancer Statistics, 2017. *Ca Cancer J Clin.* 2017; 67: 177-93.
- Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5- fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl*

Cancer Inst. 2011; 103(11): 863-75.

- Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. 2015; 148(1): 88-99.
- Sirvent A, Benistant C, Roche S. Oncogenic signaling by tyrosine kinases of the SRC family in advanced colorectal cancer. *Am J Cancer Res*. 2012; 2(4): 357–71.
- Smeby J, Sveen A, Merok MA, Danielsen SA, Eilertsen IA, Guren MG, et al. CMS-dependent prognostic impact of KRAS and BRAFV600E mutations in primary colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2018; 29(5): 1227-34.
- Snaebjornsson P, Coupe VM, Jonasson L, Meijer GA, Van Grieken NC, Jonasson JG. pT4 stage II and III colon cancers carry the worst prognosis in a nationwide survival analysis. Shepherd's local peritoneal involvement revisited. *Int J Cancer*. 2014; 135(2): 467-78.
- Song N, Qu X, Liu S, Zhang S, Liu J, Qu J, et al. Dual inhibition of MET and SRC kinase activity as a combined targeting strategy for colon cancer. *Exp Ther Med*. 2017; 14(2): 1357-66.
- Strickler JH, McCall S, Nixon AB, Brady JC, Pang H, Rushing C, et al. Phase I study of dasatinib in combination with capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab followed by an expanded cohort in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs*. 2014; 32(2): 330–39.
- Talamonti MS, Roh MS, Curley SA, Gallick GE. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest*. 1993; 91: 53–60.
- Termuhlen PM, Curley SA, Talamonti MS, Saboorian MH, Gallick GE. Site-specific differences in pp60c-src activity in human colorectal metastases. *J. Surg. Res*. 1993; 54: 293–98.
- Tournigand C, Andre T, Bonnetain F, Chibaudel B, Lledo G, Hickish T, et al. Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer trial. *J Clin Oncol* 2012; 30(27): 3353-60.
- Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*.

2005; 352(26): 2696–704.

- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 19 (96): 261-8.
- Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016; 27(8): 1386-422.
- Wainberg Z, Dering K, Ginther C, et al. Identification of predictive markers of response in colorectal cancer following treatment with dasatinib, an orally active tyrosine inhibitor of ABL and SRC. *J Clin Oncol.* 2008; 26(Suppl 20). Abst 14688 (ASCO).
- Wang Y, Jatko T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, et al. Gene Expression Profiles and Molecular Markers To Predict Recurrence of Dukes' B Colon Cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22(9): 1564-71.
- Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018; 25(6): 1454-55.
- Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results-medicare data. *J Clin Oncol.* 2011;29:4401–9.
- Wheeler DL, Iida M, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Dunn EF, Armstrong EA, et al. Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8: 696–703.
- Yamasaki M, Takemasa I, Komori T, Watanabe S, Sekimoto M, Doki Y, et al. The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2007; 30: 129-38.
- Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, Pentheroudakis G, Yamazaki K, Xu RH, et al. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO–ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Ann Oncol.* 2018; 29(1): 44-70.
- Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic

characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2014; 18: 513 (7518): 382-7.