

Departamento de Medicina
Programa de Doctorado en Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS EN EL CÁNCER COLORRECTAL:
LA VÍA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO**

Tesis doctoral

Ana Sebio García

Directores: Dra. Montserrat Baiget Bastús

Dr. Agustí Barnadas Molíns

Servicios de Genética y de Oncología Médica

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Barcelona, 2014

La **Dra. Montserrat Baiget Bastús** y el **Dr. Agustí Barnadas Molins**,
Directores respectivamente del Servicio de Genética y del Servicio de
Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, certifican:

- Que **Ana Sebio García** ha realizado bajo su dirección la presente tesis
doctoral: “**Estudios farmacogenéticos en el cáncer colorrectal: la vía del
Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico**” y que es apto para su
defensa delante de un tribunal para optar al título de Doctor en la Universitat
Autònoma de Barcelona.

- Que este trabajo ha estado realizado en el Servicio de Genética y en el
Servicio de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de
Barcelona.

Dra. M. Baiget / Dr. A. Barnadas

Directores

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración desinteresada de muchas personas que han puesto su tiempo, sus conocimientos y su apoyo a mi disposición.

En primer lugar me gustaría mostrar mi profundo agradecimiento a mis directores de tesis. A la Dra. Baiget, por darme la oportunidad de entrar en el apasionante mundo de la investigación y por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años. Gracias a la confianza que depositó en mí, he podido llevar a cabo mi pequeña aportación al mundo de la investigación en farmacogenética. Al Dr. Agustí Barnadas por despertar en mí, desde el primer momento que pisé el Hospital de Sant Pau, el interés por la investigación.

A David Páez, por ser mi “mentor”, amigo y confidente. Sin tu ejemplo y tu guía estos años no hubiesen sido posibles.

A mis amigas y compañeras de laboratorio por tantas horas maravillosas a nivel personal y profesional. A Juliana por todo lo que me ha enseñado de forma desinteresada y, en especial, por la paciencia mostrada. A Elisabeth por estar siempre dispuesta a ayudar en todos los proyectos y a dedicarme tiempo. A Laia, por su generosidad y soporte en los inicios de este bonito camino.

Gracias a todos mis compañeros de Oncología Médica por contribuir de forma activa e incesante a mi formación.

A los compañeros del Servicio de Genética por su buen humor, vitalidad y soporte, y sobre todo por su gran profesionalidad.

A mi co-R Lidia, por todos los buenos momentos durante aquellos años y porque todavía ahora en la distancia me ayuda en el día a día.

A mis padres y a mi hermana, por darme la oportunidad de cursar los estudios que me han llevado aquí y por vuestro soporte todos estos años.

De forma especial, “thank you Alan for your unconditional support and infinite patience”.

Finalmente, gracias a los pacientes y al mundo de la Oncología, que me han enseñado el valor de la salud y la vida.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la ayuda del Instituto de Salud Carlos III que me otorgó un contrato Rio Hortega (CM11/00102).

A mis padres y mi hermana.

A Alan.

*"Life is what happens to you
while you're busy making other plans"*

John Lennon

ÍNDICE

1.2.- La vía del factor de crecimiento epidérmico y el cáncer colorrectal	52
1.2.1.- La cascada de señalización	52
1.2.2.- Biomarcadores en la vía del EGFR	54
1.2.2.1.- Mutaciones somáticas	54
1.2.2.2.- Otros biomarcadores moleculares	57
1.2.2.3.- Biomarcadores clínicos	58
1.3.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer colorrectal	59
1.3.1.- Estudios farmacogenéticos de las terapias anti-EGFR	59
1.3.1.1.- El gen EGFR y sus ligandos	59
1.3.1.2.- Farmacogenética de la toxicidad mediada por anticuerpos	62
1.3.1.3.- Farmacogenética de los microRNA en la vía del EGFR.....	63
1.3.2.- Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de recto con quimiorradioterapia basada en fluoropirimidinas	66
2.- OBJETIVOS	76
3.- RESULTADOS	
3.1.1.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer colorrectal metastático	
3.1.1.1.- <i>“The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the KRAS 3'-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients”</i>	80
3.1.1.2.- <i>“Intergenic polymorphisms in the amphiregulin gene region as biomarkers in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR plus irinotecan”</i>	90

3.1.2.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer de recto localmente avanzado

3.1.2.1.- *“EGFR ligands and DNA repair genes: genomic predictors of complete response after capecitabine-based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer”* 102

4.- DISCUSIÓN

4.1.- Estudios farmacogenéticos en la vía del factor de crecimiento epidérmico en cáncer colorrectal metastásico..... 116

4.2.- Estudios farmacogenéticos en la vía del factor de crecimiento epidérmico, en los genes reparadores del ADN y en el gen de la timidilato sintetasa en cáncer de recto localmente avanzado..... 124

5.- CONCLUSIONES/CONCLUSIONS 132

6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 138

RESUMEN

La vía del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal. Esta vía de señalización está implicada en la respuesta a fármacos dirigidos directamente frente a esta vía, y en la respuesta a otros agentes citotóxicos como las radiaciones ionizantes. Existen biomarcadores que predicen la falta de respuesta a estos fármacos dirigidos en los pacientes con cáncer colorrectal metastásico (CCRm). Sin embargo, un número relevante de pacientes no responde, lo que prueba la existencia de otros factores que influyen en la respuesta. En el contexto de cáncer de recto localmente avanzado, cuyo tratamiento consiste en la administración de quimiorradioterapia de forma preoperatoria, no existe ningún marcador predictivo de respuesta a este tratamiento combinado.

Esta tesis consiste en 3 trabajos que evalúan polimorfismos localizados en los genes *EGFR*, *EGF*, *KRAS*, los ligandos del *EGFR* anfiregulina y epiregulina, genes reparadores del ADN y el gen timidilato sintetasa como biomarcadores en cáncer colorrectal. Los resultados de estos trabajos muestran: una asociación entre un polimorfismo en la región 3'UTR del gen *KRAS* y la respuesta a fármacos anti-EGFR en pacientes con CCRm; una asociación entre polimorfismos localizados en la región génica de la anfiregulina y la respuesta y supervivencia en pacientes con CCRm tratados con anti-EGFR; una asociación entre polimorfismos en la región génica de la anfiregulina y en el gen *EGFR* y la probabilidad de respuesta completa patológica tras el tratamiento con quimiorradioterapia en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.

SUMMARY

The epidermal growth factor receptor pathway is essential in the development and progression of colorectal cancer. This signalling pathway is involved in the response to drugs targeting this pathway, as well as, in the response to other cytotoxic treatments like ionizing radiation. Biomarkers are available to predict response to drugs targeting EGFR pathway in metastatic colorectal cancer (mCRC). However, a relevant number of patients do not respond to treatment, highlighting the fact that other factors might influence the response. In locally advanced rectal cancer patients the standard treatment consists of preoperative chemoradiotherapy and, in this context no biomarkers have been found.

This thesis consists of three studies in which polymorphisms located in *EGFR*, *EGF*, *KRAS*, *EGFR* ligands amphiregulin and epiregulin and DNA repair genes are evaluated as biomarkers in colorectal cancer. Results from these studies show that: there is an association between a polymorphism located in the 3'UTR region of *KRAS* and the response to anti-EGFR treatments in patients with mCRC; there is an association between polymorphisms located in the amphiregulin gene region and the response and survival in mCRC patients treated with anti-EGFR therapies; there is an association between polymorphisms located in the amphiregulin gene region and the *EGFR* gene and the probability of pathological complete response after neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El Cáncer Colorrectal

1.1.1- Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) es, en términos absolutos, el de mayor incidencia en España, donde al año se diagnostican aproximadamente un total de 25.600 nuevos casos que representan el 14.5 % de todos los nuevos tumores diagnosticados [1]. A nivel mundial, el CCR es el tercero en incidencia tras el cáncer de mama en mujeres y el cáncer de próstata en varones. En los últimos tiempos, en los países desarrollados se ha documentado una reducción en la incidencia de CCR. Este hecho se debe fundamentalmente a la introducción de programas de cribado que facilitan la extirpación de pólipos precancerosos [2].

En cuanto a la mortalidad, tras el cáncer de pulmón, el CCR representa la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial [1]. La mortalidad por CCR, al igual que la incidencia, ha descendido en las últimas décadas gracias a la combinación de las mejoras en el diagnóstico precoz y los tratamientos quirúrgicos y sistémicos.

La edad es el factor demográfico más importante en el riesgo de desarrollar CCR. La incidencia del mismo es 15 veces superior en personas mayores de 50 años que en personas de entre 20-49 años y el 94 % de las muertes se producen en individuos mayores de 50 años [3]. En cuanto a las diferencias por sexo, la incidencia y la mortalidad son aproximadamente un 30 % más altas en hombres que en mujeres. Estas diferencias se fundamentan, probablemente, en el papel protector de las hormonas femeninas y en las diferencias en la exposición a los factores de riesgo entre ambos sexos [4].

1.1.2.- Etiología

El desarrollo del CCR es un proceso multifactorial y complejo que implica tanto factores medioambientales como factores genéticos. La mayoría de los tumores son esporádicos (85%) y en ellos juegan un papel fundamental los factores medioambientales y el estilo de vida, aunque también influyen factores genéticos [4]. Aproximadamente el 15 % de todos los tumores colorrectales son hereditarios y en ellos las alteraciones en genes de susceptibilidad son determinantes para la aparición de la enfermedad [5].

1.1.2.1.- Factores medioambientales

La dieta es un factor relevante en el desarrollo del CCR. La ingesta de carne roja y grasas han sido tradicionalmente asociadas a un aumento del riesgo de desarrollar CCR [6, 7]. Sin embargo, estudios posteriores han evidenciado que, en el caso de la carne roja, este riesgo parece ser débil (riesgo relativo <1.5) y no estadísticamente significativo [8]. En el caso de la ingesta de grasas, un estudio randomizado que incluyó a más de 19.000 mujeres no demostró diferencias en la incidencia de CCR tras una reducción en la ingesta de grasas del 10% [9].

La dieta también puede actuar como un factor protector, y así, a la ingesta de pescado se le ha atribuido un efecto protector basado en la actividad antiinflamatoria de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 [10]. Sin embargo, en recientes revisiones sistemáticas esta relación entre los ácidos omega-3 y la reducción del riesgo de CCR no se ha podido confirmar [11]. Se

ha postulado que la relación entre los diferentes ácidos grasos, y no el contenido total de grasa en la dieta, sea el factor más importante de cara al riesgo de desarrollar CCR [12]. Otros productos alimenticios a los que se les ha asociado un posible valor protector son la fibra, el calcio, la vitamina D y la fruta y verduras, así como al selenio y los antioxidantes [13-16].

Los factores no alimenticios como el índice de masa corporal y la actividad física también juegan un papel relevante en el desarrollo del CCR [17, 18]. De la misma forma, y aunque en menor medida que en otros cánceres, el tabaco y el alcohol también favorecerían el desarrollo de CCR [19, 20]. La tabla 1 muestra los factores medioambientales y dietéticos más importantes y el su riesgo relativo asociado al CCR.

Introducción

FACTORES PROTECTORES Y DE RIESGO EN CÁNCER COLORRECTAL	
	Riesgo relativo
Factores que aumentan el riesgo	
Herencia familiar/ Antecedentes patológicos	
• Un familiar de primer grado	2.2
• Más de un familiar de primer grado	4.0
• Un familiar diagnosticado antes de los 45 años	3.9
Enfermedad inflamatoria intestinal	
• Enfermedad de Crohn	2.6
• Colitis ulcerosa	
o Colon	2.8
o Recto	1.9
Diabetes	1.2
Otros factores	
• Obesidad	1.2
• Consumo de carne roja	1.2
• Tabaquismo	1.2
• Consumo de alcohol	1.2
Factores que reducen el riesgo	
Actividad física	
• Hombres	0.8
• Mujeres	0.7
Consumo de calcio	0.8

Tabla 1. Riesgo relativo para los factores protectores y de riesgo de cáncer colorrectal.

(Adaptada de “Colorectal cáncer facts and figures” 2011-2013, American Cancer Society.)

1.1.2.2.- Factores genéticos y bases moleculares

En las últimas décadas los avances en genética han permitido profundizar en el conocimiento de las bases moleculares que influyen en el desarrollo y la progresión del cáncer. Actualmente, se definen tres vías principales en el desarrollo del CCR, aunque existen otras vías moleculares que también están implicadas. Además, la alteración de genes supresores de tumores y oncogenes juega un papel fundamental en el desarrollo del CCR [21].

1.1.2.2.1.- Vías moleculares del cáncer colorrectal

Más del 90% de los CCR se desarrollan a partir de adenomas, lo que se conoce como “secuencia adenoma-carcinoma”. Esta secuencia se caracteriza por una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que se agrupan fundamentalmente en tres vías moleculares que se describen a continuación y se esquematizan en la Figura 1.

Vía de la Inestabilidad Cromosómica (CIN)

Esta vía se caracteriza por alteraciones que incluyen amplificaciones, deleciones y reordenamientos, y por mutaciones en el gen *APC*. El proceso central de esta vía es el funcionamiento incorrecto de la vía Wnt/APC/ β -catenina. En condiciones normales, la onco-proteína β -catenina forma un complejo con las proteínas APC, axina, caseína quinasa 1a y glicógeno sintasa-3 β (GSK3 β) que finaliza en la degradación de β -catenina a través del sistema ubiquitin-proteosoma. La destrucción de este complejo tiene como resultado el control de la cantidad de β -catenina que se transloca al núcleo. En el núcleo y gracias a diferentes coactivadores, β -catenina activa la transcripción de varios genes diana entre los que se encuentran genes que favorecen la proliferación celular como c-Myc y ciclina D [22]. Las mutaciones en el gen *APC* (presentes hasta en el 80% de los casos) son la causa más frecuente de mal funcionamiento de esta vía y una de las alteraciones moleculares más frecuentes en CCR [23]. La forma hereditaria de este tipo de CCR se conoce como Poliposis Adenomatosa familiar (PAF), en la que existe una mutación germinal en un alelo del gen *APC*. La pérdida de función o inactivación

Introducción

somática del segundo alelo se puede producir por varias causas: por la pérdida del brazo largo del cromosoma 5, por la metilación de la región promotora del gen APC o por una mutación inactivadora del alelo nativo del gen APC. La forma esporádica de CCR asociado a la vía CIN, ocurre debido a una gran variedad de mutaciones en uno o más miembros de la vía de señalización de Wnt y que incluyen mutaciones en los genes β -catenina, SOX9, ARID1A, FAM123B, la familia DKK y TCF7L2 [24]. Los eventos genéticos posteriores característicos de esta vía incluyen deleciones y desbalances alélicos, así como mutaciones en oncogenes KRAS o PI3K, o mutaciones en genes supresores como TP53.

Vía de la Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

Esta vía también que se conoce como “vía del fenotipo mutador”, representa el 15-20 % de todos los tumores colorrectales. Se caracteriza por la inactivación de los genes de reparación “mismatch” (MMR) del ADN, lo que da lugar a un incremento en el número de mutaciones [25]. Además, la incapacidad de la célula de reparar el ADN, lleva asociado un epifenómeno conocido como Inestabilidad de Microsatélites (MSI). Los microsatélites son secuencias cortas y repetitivas de ADN que se encuentran repartidos a lo largo del genoma. Estos microsatélites son particularmente sensibles a la falta del correcto funcionamiento de los genes MMR para reparar los defectos que ocurren durante la replicación del ADN. Por este motivo, los fallos en la reparación del ADN dan lugar a cambios en el tamaño y en el número de los microsatélites [26, 27].

La forma hereditaria de los tumores colorrectales desarrollados a través de esta vía se conoce como Síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (HNPCC). Se caracteriza por una mutación en la línea germinal en los genes de reparación: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*. Las mutaciones en *MLH1* y *MSH2* representan el 90% de los casos. En la forma esporádica de este tipo de CCR, se produce la hipermetilación del promotor de *MLH1* con la consecuente inactivación del gen [28]. Los eventos posteriores característicos de esta vía incluyen un porcentaje elevado de mutaciones por alteración en el marco de lectura (“frameshift”) en distintos genes. Este tipo de cáncer colorrectal, caracterizado por la inestabilidad de microsatélites y una deficiente reparación del ADN, se desarrolla fundamentalmente en el colon proximal y en los casos esporádicos es más frecuente en pacientes de edad avanzada y sexo femenino.

Metilación de Islas CpG (CIMP)

Esta vía está caracterizada por la hipermetilación de la región promotora y los exones iniciales de un largo número de genes que contienen islas de dinucleótidos CpG en sus secuencias [29-31]. Las bases moleculares de este tipo de CCR comprenden el silencio transcripcional de los genes que adquieren esta hipermetilación y también alteraciones en la estructura de la cromatina.

Otras vías moleculares

Existen otras vías menos estudiadas implicadas en el desarrollo del CCR. Una de ellas, se caracteriza por anomalías en la línea germinal del gen de reparación por escisión *MutYH*. En estos casos, el cáncer se manifiesta únicamente siguiendo un modelo de herencia recesivo. El fenotipo clínico es similar a una PAF atenuada con un número menor de adenomas que desemboca en un CCR de desarrollo más tardío. La progresión molecular en esta vía incluye con frecuencia mutaciones G>T en diversos genes y frecuentes pérdidas alélicas siendo estas características las que se producen en el cromosoma 18q [32].

Otra de las vías, que no presenta inestabilidad de microsatélites, se caracteriza por la presencia de un elevado número de mutaciones en genes de reparación “mismatch”, *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* y *PMS2* o mutaciones en los genes de la ADN polimerasa, en particular *POLE* [33].

La tabla 2 resume las características moleculares de las diferentes vías de CCR. La figura 1 resume las frecuencias de los diferentes tipos de CCR.

VÍA MOLECULAR	BASE MOLECULAR	EVENTOS POSTERIORES
Inestabilidad Cromosómica (CIN)	APC-β-catenina en la vía Wnt	Disbalances alélicos y mutaciones genéticas
	Tipo hereditario PAF	
Inestabilidad de Microsatélites (MSI)	Genes de reparación de "mismatch"	Mutaciones genéticas
	Forma hereditaria: Síndrome de Lynch, HNPCC	
	Forma esporádica: hipermetilación del gen MLH1	
Metilación de Islas CpG (CIMP)	Disregulación de ADN metiltransferasas	Silenciamiento transcripcional, alteraciones
MUTYH	MutYH gene de reparación por excisión de bases	Mutaciones G>T, delección de 18q, pérdida de heterocigosidad etc.
	Forma hereditaria: recesiva	
Ultramutado	Múltiples genes de reparación "mismatch" o el gen de la ADN polimerasa	Disbalances alélicos y mutaciones genéticas

Tabla 2. Resumen de las vías moleculares implicadas en el cáncer colorrectal

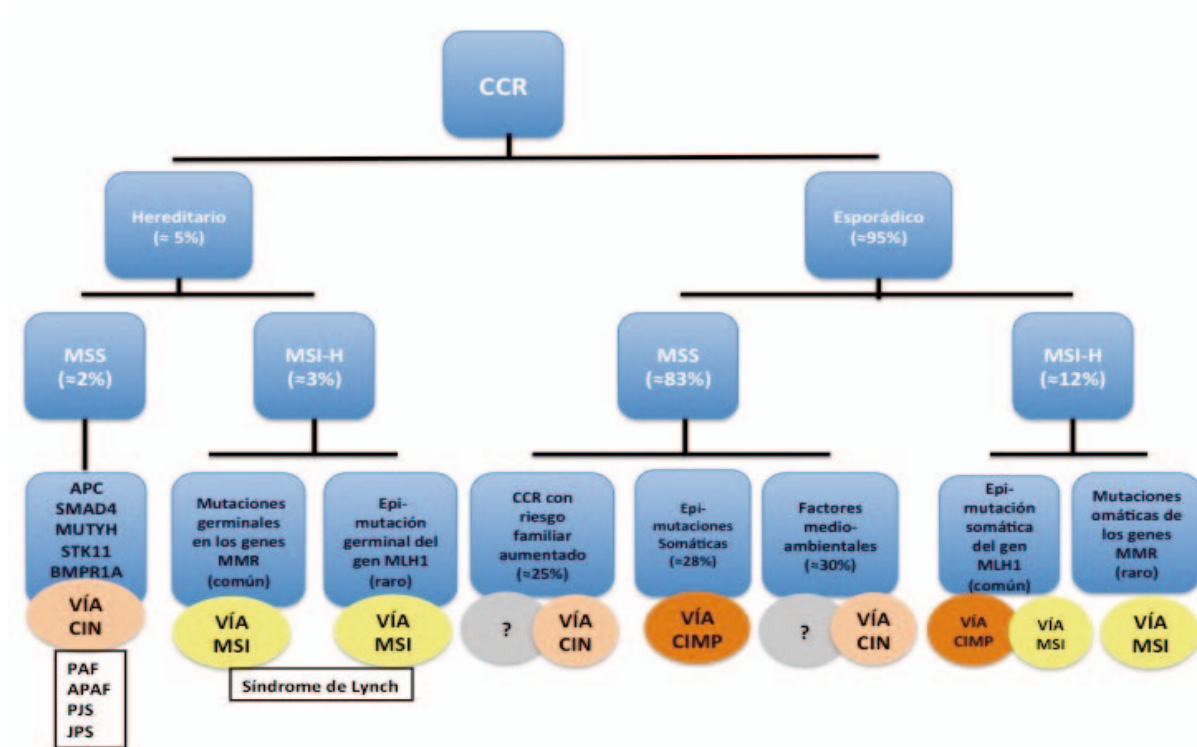


Figura 1. Esquema de las vías moleculares del cáncer colorrectal. Abreviaturas: CCR, cáncer colorrectal; MSS, estabilidad de microsatélites; MSI-H: inestabilidad de microsatélites alta; PAF: poliposisadenomatosa familiar; APAF: poliposisadenomatosa familiar atenuada; PJS: síndrome de Peutz-Jeghers; JPS: síndrome de poliposis juvenil; CIN: inestabilidad cromosómica; CIMP: metilación de islas CpG; ?:vías todavía por definir

1.1.2.2.2.-Oncogenes y genes supresores

Los protooncogenes Ras

La familia de los protooncogenes *RAS* que comprende *KRAS*, *NRAS* y *HRAS*, es un conjunto de reguladores moleculares muy relevantes para diversas vías de señalización implicadas en el control de la proliferación, diferenciación, adhesión, migración celular [34].

El oncogen *KRAS* juega un papel fundamental en la secuencia adenoma-carcinoma. Este gen codifica para una proteína con actividad GTP-asa que está implicada en la regulación de diferentes vías relacionadas con la diferenciación celular [35]. Las mutaciones en el gen *KRAS* se asocian a un incremento de la proliferación celular y están presentes el 35-45% de los pacientes con adenomas o carcinomas colorrectales [36, 37].

En CCR también se han descrito mutaciones en el gen *NRAS*, aunque estas son menos frecuentes que las localizadas en *KRAS*. En la mayoría de tumores, no coexisten mutaciones en *KRAS* y *NRAS*, por lo que se consideran excluyentes [38].

El protooncogen BRAF

El protooncogen *BRAF* codifica para una proteína serina/treoninquinasa de la familia RAF. Las proteínas ARAF y CRAF son otros miembros de la familia RAF, sin embargo *BRAF* es la que se une con mayor afinidad a las proteínas *RAS* [39]. *BRAF* se encuentra mutado en aproximadamente entre un 5-15% de los tumores colorrectales, siendo la mutación más frecuente V600E (cambio del aminoácidovalina al ácido glutámico). La frecuencia de la mutación de *BRAF*

Introducción

difiere según se trate de tumores con MSI (hasta un 80%) o de tumores sin inestabilidad de microsatélites (MSS)(aproximadamente un 10 %) [40].

El protooncogen PI3K

El protooncogen *PI3K*, y en concreto el gen que codifica para la subunidad p110 α , *PIK3CA*, aparece mutado en un 15-20 % de los pacientes con carcinoma colorrectal. Estas mutaciones se localizan fundamentalmente en los exones 9 y 20. El aumento de función proporcionado por las mutaciones localizadas en el exón 20 es independiente de la interacción con Ras, mientras que las mutaciones en el exón 9 dependen de la interacción Ras-GTP para dar lugar a este aumento de función.

El Gen Supresor TP53

El gen *TP53* se conoce como “el guardián del genoma” ya que su función es bloquear la proliferación celular en la presencia de ADN dañado. Además, también promueve la reparación del ADN y es capaz de dar lugar a apoptosis celular en el caso de que dicha reparación sea insuficiente [41].

En CCR se han detectado mutaciones en *TP53* hasta en un 70% de los tumores [21].

1.1.3.- Características anatómicas y patológicas del cáncer colorrectal

1.1.3.1.- Características anatómicas

El CCR se puede desarrollar en cualquier localización entre el íleon terminal y el canal anal. El colon se divide en cuatro segmentos: colon derecho o ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide. El segmento sigmoide se continúa con el recto y éste con el canal anal. El denominado colon derecho comprende el ciego y el colon ascendente cuya parte posterior está en contacto con el retroperitoneo. A nivel del ángulo hepático el colon ascendente se continúa con el transverso, localizado intraperitonealmente, y que a nivel de la flexura esplénica se continúa con el colon descendente. La parte posterior del colon descendente se encuentra también en contacto con el retroperitoneo. El colon descendente se continúa con el colon sigmoide que es completamente intraperitoneal. A continuación se encuentra el recto, que es una estructura fundamentalmente extraperitoneal que mide entre 10 a 15 cm desde el margen anal. El recto se divide en tercio bajo, tercio medio y tercio superior. Esta división junto con la proximidad al margen anal tiene implicaciones terapéuticas ya que influye en el tipo de cirugía a realizar. El drenaje linfático del colon se realiza mediante los ganglios pericólicos a nivel del borde mesocólico del colon. El drenaje linfático del recto varía según la porción: el recto superior vía arteria mesentérica inferior, ganglios presacros y de las ilíacas internas y del recto inferior vía las cadenas ilíacas inguinales e ilíacas externas. La Figura 2 esquematiza la anatomía del colon y del recto.



Figura 2. Esquema de la anatomía del colon y del recto

Desde su origen primario en el colon o en el recto, las células tumorales pueden migrar dando lugar a la diseminación de la enfermedad. Existen 4 vías fundamentales de diseminación del CCR:

1. Directa: Se produce por continuidad a través de la pared intestinal mediante la invasión de estructuras vecinas.
2. Linfática: Las células tumorales alcanzan el sistema de vasos linfáticos y se depositan en los ganglios. Una exéresis quirúrgica total de los trayectos linfáticos correspondientes al segmento resecado es importante para la detección y la eliminación de los ganglios afectados.

3. Hematógena: Las células tumorales alcanzan el torrente sanguíneo. Las principales localizaciones de metástasis vía hematológica del cáncer colorrectal son hígado, pulmón y hueso.
4. Carcinomatosis peritoneal: Consiste en la invasión por parte de células tumorales del peritoneo parietal, el epiplon y el peritoneo visceral. Puede conllevar la aparición de ascitis.

1.1.3.2.- Características patológicas

La histología del cáncer colorrectal es fundamentalmente tumores epiteliales y fundamentalmente el adenocarcinoma (90-95%). Otros tipos menos frecuentes son: el adenocarcinoma mucinoso (Figura 3) que se caracteriza por estar formado en más del 50% por mucina extracelular; el carcinoma en células de anillo de sello que se caracteriza por presentar en más del 50% de la lesión prominentes vacuolas de mucina intracitoplasmática que desplazan el núcleo celular; el carcinoma medular cuyas características incluyen un nucléolo prominente, abundante citoplasma eosinófilo y poca formación glandular; el carcinoma adenoescamoso y el carcinoma indiferenciado.

Otro grupo de tumores de colon no epiteliales y más infrecuentes está formado por linfomas, melanomas, leiomiomas o tumores del estroma gastrointestinal[32].

El grado tumoral: los adenocarcinomas se caracterizan por una formación glandular que, en los adenocarcinomas bien diferenciados representa más del 95% del tumor, en los moderadamente diferenciados un 50-95 % y en

Introducción

los pobremente diferenciados menos del 50%. En la práctica diaria más del 70% se clasifican como moderadamente diferenciados, representando los bien diferenciados un 20 % y los pobremente diferenciados sólo un 10 % [42].

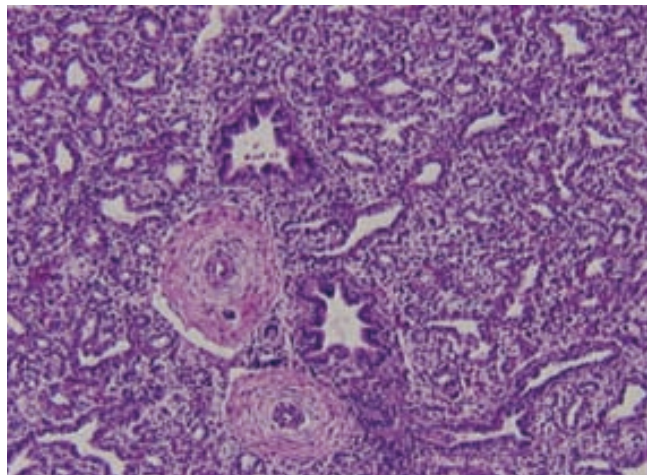


Figura 3. Adenocarcinoma mucinoso de colon.

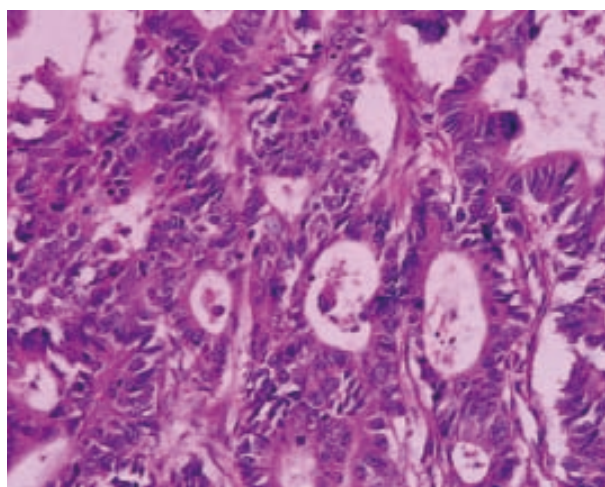


Figura 4. Adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado

1.1.4.- Cribado poblacional y diagnóstico

Las etapas iniciales del CCR suelen ser normalmente asintomáticas. A medida que el tumor se desarrolla, y dependiendo de la localización, pueden estar presentes diferentes síntomas tales como cambios en el hábito deposicional, dolor abdominal difuso o localizado, pérdida de peso, sangrado o astenia.

Para el cribado poblacional, no existe una prueba considerada estándar y los modelos de cribado poblacional varían significativamente entre países. Actualmente en España existen varios programas piloto en diferentes Comunidades Autónomas, pero no existe un programa nacional de cribado.

Existen en la actualidad 5 pruebas diagnósticas y de cribado para el CCR que se describen a continuación:

1.- La colonoscopia se considera el “gold standard” para el diagnóstico del carcinoma colorrectal debido a su alta sensibilidad y especificidad para la identificación de pólipos, así como por la posibilidad que ofrece para realizar biopsias *in situ* de lesiones sospechosas. Los inconvenientes y riesgos de la colonoscopia incluyen perforaciones del colon e infecciones, además de ser una prueba operador-dependiente y de presentar un elevado coste sanitario.

2.- La sigmoidoscopia, que consiste en la evaluación únicamente del colon sigmoide, ha demostrado en tres ensayos clínicos randomizados reducir la incidencia y la mortalidad por CCR [43-45]. Sin embargo la obvia limitación de esta prueba es la evaluación de un único segmento

del colon, con la consiguiente posibilidad de falsos negativos. Así mismo, al igual que la colonoscopia completa presenta riesgos y también es operador-dependiente.

3.- La prueba de sangre oculta en heces ha demostrado en un metaanálisis que incluyó cuatro estudios randomizados, ser una buena prueba de cribado poblacional y reducir la mortalidad por CCR [46-48]. Los puntos débiles de esta prueba diagnóstica son un elevado número de falsos positivos que requieren pruebas posteriores.

4.- El enema de bario consiste en la ingesta por parte del paciente de un contraste baritado y la posterior realización de radiografía simple para la valoración del trayecto realizado por dicho contraste. Esta prueba presenta como limitaciones una baja sensibilidad para detectar pólipos, la necesidad de una preparación del colon exhaustiva y la necesidad de ser valorada por un radiólogo experto [49]. Debido a esto y tras la aparición de la TAC colonoscopia el enema de bario se encuentra, prácticamente, en desuso.

5.- La TAC colonoscopia es la técnica más reciente para el diagnóstico en CCR. En un metaanálisis, la TAC colonoscopia ha demostrado tener alta sensibilidad y especificidad para pólipos con un tamaño mayor o igual a 10 mm, pero una reducida sensibilidad y especificidad para pólipos de menor tamaño [50]. Esta técnica es relativamente no invasiva pero presenta el inconveniente de ser operador-dependiente y de identificar lesiones/hallazgos que no son clínicamente relevantes.

Existen otra serie de pruebas moleculares actualmente en estudio, realizadas fundamentalmente en heces y otros fluidos corporales [51]. Las basadas en ADN fecal se encuentran en una fase avanzada del desarrollo, pero de momento la evidencia clínica no es suficiente como para que sean aceptadas para el diagnóstico o cribado poblacional del CCR [52].

1.1.5.- Factores pronósticos

Un factor pronóstico es aquella situación, afección o característica del paciente que, independientemente del tratamiento que éste reciba, puede usarse para predecir el curso clínico de una enfermedad. En el CCR son los factores clínicos los que aportan más información sobre el pronóstico del paciente. La determinación del pronóstico de un paciente es de vital importancia de cara a plantear un tratamiento y un seguimiento. Tras un tratamiento con intención curativa, la detección de pacientes de alto riesgo de recidiva es fundamental para poder determinar aquellos que se beneficiarán más de un tratamiento intensivo. Paralelamente, la detección de pacientes de bajo riesgo de recaída podría ahorrar tratamientos y costes innecesarios. En el contexto de la enfermedad metastásica, la identificación mediante factores pronósticos de tumores indolentes en contraposición a aquellos más agresivos, supondría la posibilidad de ajustar la intensidad y toxicidad de los tratamientos.

1.1.5.1.- Factores pronósticos clínicos

La clasificación TNM (de las siglas en inglés “tumor node metástases”) es el factor pronóstico más importante en la mayoría de los tumores sólidos y también en el CCR (Tabla 3). La T define la profundidad de afectación del tumor a través de las capas de la pared del colon, y va desde Tis, en el que el tumor se encuentra localizado a nivel intramucoso, a T4 en el que el tumor ha invadido todas las capas de la pared y está afectando a órganos adyacentes y/o cavidad peritoneal. La N está definida por el número de ganglios

locorregionales afectados y la M define la presencia o ausencia de metástasis [53]. Las diferentes T, N y M dan lugar a la clasificación por estadios. El estadio I comprende los tumores más iniciales en los que el tumor no ha sobrepasado la capa submucosa. En el estadio II, el tumor ha sobrepasado la submucosa e invade la muscularis propia y los ganglios no están afectados. En el estadio III los ganglios regionales están invadidos por células tumorales y por último, en el estadio IV se han detectado metástasis en localizaciones distantes del tumor primario. La supervivencia es claramente superior cuando menor es el estadio: la supervivencia a 60 meses es aproximadamente del 93.2% para el estadio I, 84.7% para el estadio IIa, 72.2% para el estadio IIb, 83.4% para el estadio IIIa, 64.1% para el estadio IIIb, 44.3% para el estadio IIIc y 8% para el estadio IV [54]. Históricamente y previo a la aparición de la clasificación TNM la clasificación más empleada era la de Dukes.

Clasificación TNM				
Tumor primario (T)				
Tx No se puede evaluar la invasión del tumor				
Tis Intraepitelial o intramucosa				
T1 Invasión de la submucosa				
T2 Invasión de la muscular propia, sin sobrepasarla				
T3 Invasión de la serosa o la grasa pericólica				
T4 Invasión de órganos adyacentes y/o cavidad peritoneal				
Afectación ganglionar (N)				
Nx No se puede evaluar la presencia de ganglios afectados				
N0 Ausencia de ganglios afectados				
N1 Afectación de 1-3 ganglios				
N1a Afectación de 1 ganglio				
N1b Afectación de 2 a 3 ganglios				
N1c Presencia de depósitos tumorales en la subserosa o en los tejidos mesentéricos o pericólicos o perirrectales				
N2 Afectación de 4 o más ganglios				
N2a Afectación de 4 a 6 ganglios				
N2b Afectación de 7 o más ganglios				
Metástasis a distancia (M)				
Mx No se puede evaluar la presencia de metástasis a distancia				
M0 Ausencia de metástasis a distancia				
M1 Presencia de metástasis a distancia				
Estadios TNM		Dukes		
Estadio 0	Tis	N0	M0	-
Estadio I	T1-2	N0	M0	A
Estadio II	T3-4	N0	M0	B
Estadio III	T1-4	N1-2	M0	C
Estadio IV	T1-4	N0-2	M1	-

Tabla 3. Clasificación TNM y Dukes del carcinoma colorrectal

Nota: cuando la letra “c” precede a la clasificación TNM se refiere al estadio clínico/radiológico y cuando es precedida de la letra y se refiere al estadio patológico-quirúrgico tras recibir tratamiento. Cuando la letra “y” precede a la clasificación TNM indica que se ha administrado tratamiento previo.

El número de ganglios linfáticos resecados y evaluados es otro de los factores pronósticos más importantes en CCR. Desde la primera descripción de que la afectación de los ganglios locorreionales es un factor pronóstico negativo en cáncer de colon por Cuthbert Dukes en 1932 [55], diferentes estudios han evaluado el número de ganglios resecados y analizados, demostrando que una completa linfadenectomía y un cuidadoso examen de los ganglios resecados es un factor pronóstico en sí mismo, incluso en pacientes sin ganglios afectos [56, 57]. Una correcta linfadenectomía facilita la adecuada clasificación de los pacientes, lo que conlleva implicaciones terapéuticas como la necesidad de administrar un tratamiento adyuvante. En la actualidad se recomienda que la linfadenectomía y posterior evaluación incluya al menos 12 ganglios [58].

Las características histopatológicas también han demostrado tener un valor pronóstico. Tras una evaluación del registro nacional de cáncer de Estados Unidos (SEER, Surveillance, Epidemiology and End Results Program) se demostró estadísticamente una supervivencia a 5 años superior para los subtipos histológicos adenocarcinoma y adenocarcinoma mucinoso (66% y 62%, respectivamente) en comparación con el subtipo de células en anillo de sello (36%), aunque estas diferencias excluían el estadio I. De igual forma se reportó una mayor supervivencia a los 5 años para los tumores localizados en sigma (70%) frente a los localizados en colon derecho (64%) [54].

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es un antígeno oncofetal detectable en el suero que se sobreexpresa en un porcentaje elevado de adenocarcinomas de colon y recto. Sin embargo, es un marcador imperfecto ya que aproximadamente un 30% de los tumores colorrectales no lo expresa, en

Introducción

particular los tumores pobremente diferenciados [59]. Los niveles de CEA se ven alterados por otros factores como el tabaquismo activo, la inflamación, la hepatitis y la colitis. La determinación de los niveles de CEA tiene un papel definido en el seguimiento de los pacientes con tumores estadio II y III y está incluido en la mayoría de guías clínicas. Sin embargo, su papel como factor pronóstico es más controvertido. Se ha reportado de especial interés en los pacientes con enfermedad metastática limitada en hígado. En un estudio prospectivo la medición del CEA pre y post cirugía hepática reveló al CEA como un factor pronóstico independiente para la supervivencia global de los pacientes [60].

La ausencia de células tumorales viables tras el tratamiento neoadyuvante (respuesta completa patológica, ypCR) en cáncer de recto localmente avanzado es considerada un factor pronóstico, ya que los pacientes con ypCR presentan una disminución de la probabilidad de recaída y una mayor supervivencia [61, 62]. Una de las clasificaciones más empleadas para valorar el grado de respuesta patológica tras quimiorradioterapia neoadyuvante, es la descrita por Mandola *et al.* que clasifica según el grado de regresión tumoral (TRG) en 5 subtipos de respuesta: TRG1: equivalente a respuesta completa patológica en el que no existe carcinoma residual y la fibrosis se extiende por las diferentes capas de la pared rectal; TRG2: presencia de alguna célula tumoral residual en una pieza constituida fundamentalmente por fibrosis; TRG3: abundante número de células tumorales residuales pero con mayor porcentaje de fibrosis; TRG4: el porcentaje de células tumorales es superior al de fibrosis; TRG5: ausencia de cambios tras el tratamiento [63] (Figura 5)

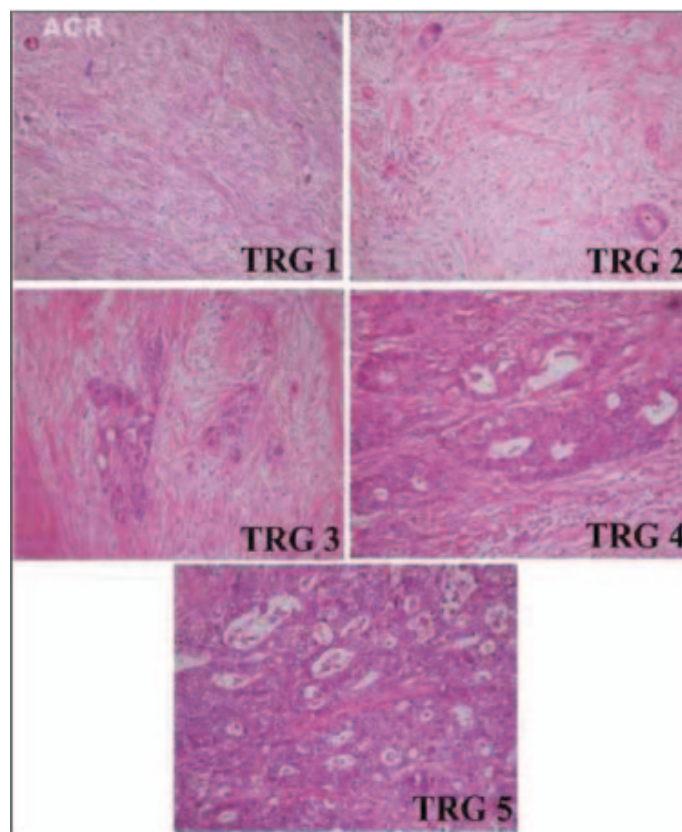


Figura 5. Grados de regresión patológica

Uno de los factores pronósticos clínicos más recientes es la clasificación pronóstica de Köhne. Esta clasificación deriva del estudio de 3825 pacientes con CCR avanzado y tratados con 5-Fluorouracilo, en la que Köhne et al. propusieron una clasificación pronóstica basada en la evaluación de 4 parámetros clínicos: el estado funcional medido mediante la escala del Eastern Cooperative Oncologic Group (ECOG), el recuento de leucocitos, los niveles de fosfatasa alcalina en sangre y el número de localizaciones metastásicas. Este trabajo clasificó a los pacientes en tres grupos pronósticos según estas características:

Introducción

- Riesgo Bajo: ECOG 0-1 y una sola localización metastásica
- Riesgo intermedio: ECOG 0-1, más de una localización metastásica y fosfatasa alcalina <300 U/L; o pacientes con ECOG >1 , recuento de leucocitos $<10 \times 10^9/L$ y una sola localización metastásica.
- Riesgo alto: ECOG 0-1, fosfatasa alcalina ≥ 300 U/L; o pacientes con ECOG >1 , recuento leucocitario $>10 \times 10^9/L$ y más de una localización metastásica.

Otros factores pronósticos con una evidencia menos consistente incluyen la infiltración linfocítica o las micrometástasis ganglionares. La infiltración linfocítica peritumoral refleja una respuesta inmune del huésped y se ha sugerido que confiere un mecanismo de resistencia frente al tumor [64, 65]. Las micrometástasis ganglionares se definen como un grupo solitario de células tumorales que miden un máximo de 2mm en un ganglio considerado por lo demás negativo. La presencia en la pieza patológica de dichas micrometástasis ha sido propuesta como marcador pronóstico en pacientes con cáncer de colon estadio II [66].

1.1.5.2.- Factores pronósticos moleculares

Como se ha comentado en el apartado de factores genéticos y bases moleculares, la inestabilidad de microsatélites es una de las vías moleculares de la carcinogénesis del CCR. Diversos estudios han evaluado la presencia de MSI como factor pronóstico en CCR. En una revisión sistemática y meta-análisis que incluyó 32 estudios, se reportó un beneficio en supervivencia

para los pacientes con tumores con alta MSI en comparación con aquellos tumores MSS (HR: 0.65, 95% CI 0.59-0.71) y este efecto se mantuvo tras estratificar por estadio tumoral [67]. En el primer estudio prospectivo que valoraba el estado de la inestabilidad de microsatélites como factor pronóstico y que englobaba 5 ensayos clínicos randomizados de quimioterapia adyuvante, se reportó un mejor pronóstico para los pacientes con alta MSI que no recibieron tratamiento adyuvante, frente a aquellos pacientes con baja MSI (88% vs 68% de supervivencia a 5 años; $p= 0.009$) [68].

En cáncer colorrectal metastásico, la MSI se identifica en un menor número de pacientes. En un estudio comparativo, los tumores con alta MSI representaban un 14% de los estadios avanzados, mientras que representaban un 53% en los estadios I a III, posiblemente como reflejo de la menor capacidad de metastatizar de estos tumores [69].

La inestabilidad de microsatélites parece ser por lo tanto un factor pronóstico de especial interés en estadios iniciales. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido aceptado como un factor pronóstico establecido en las guías terapéuticas de la Asociación Americana de Oncología Clínica (ASCO) o la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO).

Pérdida de heterocigosidad del cromosoma 18q. El cromosoma 18 contiene importantes genes implicados en la carcinogénesis del CCR. La pérdida del cromosoma 18q (18qLOH) se asocia con frecuencia a la inestabilidad cromosómica y muy infrecuentemente a la inestabilidad de microsatélites [70].

Introducción

El significado pronóstico de 18qLOH ha sido evaluado en diversos estudios. En un estudio retrospectivo la pérdida alélica 18q se demostró más frecuente en pacientes con estadio III comparado con aquellos pacientes en estadio II. Sin embargo solo en los pacientes con estadio II se reportó un valor pronóstico negativo (HR: 2.46, 95%CI 1.06-5.71; $p= 0.036$) [71]. El primer estudio prospectivo para evaluar 18qLOH en pacientes con CCR estadio II que no recibieron quimioterapia adyuvante demostró una mejor supervivencia a 5 años para los pacientes con 18q intacto [72]. Sin embargo, estudios posteriores no han confirmado estos hallazgos [73], y por lo tanto la pérdida de heterocigosidad del 18q no es un factor pronóstico establecido.

La inestabilidad cromosómica (CIN), otra de las vías moleculares implicadas en el desarrollo del CCR también ha sido estudiada como factor pronóstico. En un meta-análisis que evaluó la presencia de CIN como un factor pronóstico se reportó que los pacientes estadios II y III con CIN tenían una peor supervivencia en comparación con pacientes sin CIN (HR: 1.45, 95%CI 1.35-1.55; $p< 0.001$) [74]. Los tumores con CIN incluyen alteraciones como MSS, aneuploidias o poliploidias y mutaciones en genes relevantes como APC.

El gen *BRAF*. Las mutaciones del gen *BRAF* (fundamentalmente V600E) están presentes en aproximadamente un 5-15% de los tumores colorrectales. El valor pronóstico de esta mutación ha sido evaluado de forma retrospectiva en varios estudios en el contexto de enfermedad metastásica, y actualmente se

considera esta mutación un factor de mal pronóstico establecido en este contexto [75-77].

Otros factores pronósticos estudiados aunque sin firme evidencia incluyen: las mutaciones en *TP53* o las mutaciones en *PI3KCA*. Las mutaciones en el gen *TP53* han sido reportadas de forma inconsistente como un factor pronóstico. El grupo cooperativo TP53-CCR, evaluó el papel pronóstico de p53 en 3583 pacientes con CCR resecao y estratificados por localización tumoral, estadio, tipo de mutación en TP53 y el uso de quimioterapia adyuvante. Se reportaron un 42% de mutaciones en *TP53*, más frecuentes en colon distal y recto. En el análisis multivariado, solo mutaciones de *TP53* con deleciones que daban lugar a pérdida de aminoácidos se asociaron con un peor pronóstico (HR: 2.52, 95% CI 1.03-1.79; p= 0.03) [78]. Las mutaciones en el gen *PI3KCA*, localizado en una de las vías efectoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), han sido evaluadas en diversos estudios en el contexto de enfermedad avanzada. En un análisis que incluyó 450 pacientes con estadios I a III se encontró prevalencia de mutaciones en *PI3KCA* del 18%, y una asociación de la mutación de *PI3KCA* con una peor supervivencia (HR: 2.23, 95% CI 1.21-4.11) en el análisis multivariado. Sin embargo, esta mutación se encontró asociada a otros factores como la falta de expresión de TP53 o las mutaciones en el gen *KRAS*, dificultando la interpretación de los resultados [79]. Además de factores pronósticos individuales, distintas firmas genéticas que incluyen la evaluación de varios genes implicados en el desarrollo y progresión del CCR han sido evaluadas como factores pronóstico [80-82].

Introducción

Recientemente, se han conocido los datos del “Colorectal cáncer consortium-CRCSC” que engloba diferentes universidades y grupos con el fin de definir subtipos moleculares de CCR. Este consorcio ha reunido más de 4562 muestras de CCR caracterizadas molecularmente, en su mayoría estadios II y III, mediante varias plataformas. Fruto de este trabajo se han definido 4 subtipos moleculares de cáncer colorrectal (CMS 1-4) y un grupo inclasificable de pacientes (Tabla 4). Estos subtipos moleculares definen grupos de pacientes con un pronóstico diferente [83].

CMS 1 14%	Mujeres, colon derecho, mayor edad	MSI-H, hipermutación, BRAF mut, activación inmune Supervivencia intermedia
CMS 2 41%	Colon izquierdo	Epitelial, MSS, CIN alto, TP53 mut, activación de Myc/Wnt Mejor supervivencia
CMS 3 8%		Epitelial, heterogeneo MSI y CIN, KRAS mut, sobreexpresión de IGFBP2 Supervivencia intermedia
CMS 4 20%	Edad joven, estadios III y IV	Mesenquimal, CIN/MSI, activación TGFb/VEGF, sobreexpresión de NOTCH3 Peor supervivencia
No Clasific.		Infiltración inmune y estromal, activación epitelio mesénquima variable

Tabla 4. Clasificación molecular del cáncer de colon

Adaptada de Dientsmann et al. ASCO meeting 2014.

1.1.6.- Tratamiento de la enfermedad localizada

1.1.6.1 Aspectos quirúrgicos

1.1.6.1.1.- Cirugía del cáncer de colon

En la era previa a la anestesia, el mejor tratamiento que podía ofrecerse a algunos pacientes con cáncer de colon era la colostomía descompresiva para aliviar la obstrucción causada por un tumor. La primera colostomía fue realizada por Pierre Fine en Génova en 1797, tras la cual la paciente sobrevivió 3 meses. En 1823, Jean Francis Reybard realizó con éxito y sin anestesia la primera resección de sigma [84].

La cirugía del cáncer de colon tiene 4 objetivos fundamentales. El primero es la resección de la lesión con 5 cm de margen así como la resección de la vasculatura que irriga dicha lesión y de su drenaje linfático. El segundo, la resección en bloque de la lesión y las estructuras contiguas. En tercer lugar, el objetivo es el restablecimiento de la continuidad y tránsito del colon. Y en último lugar, es también objetivo de la cirugía la reinserción social y laboral del paciente.

En todas las cirugías de tumores colorrectales, se debe realizar además una cuidadosa exploración de los órganos abdominales con especial atención al omento, hígado y superficie peritoneal para evaluar la posible presencia de enfermedad metastásica que no haya sido visualizada por técnicas de imagen.

Dependiendo de la localización del tumor existen diferentes tipos de cirugías para el cáncer de colon:

Introducción

- La hemicolecotomía derecha: es la técnica reservada para tumores localizados en ciego, colon ascendente e incluso para algunos tumores de ángulo hepático. En este procedimiento se reseca el íleon terminal, el ciego, y el colon ascendente hasta ángulo hepático, ligándose en su origen la arteria ileocólica, la arteria cólica derecha y la rama derecha de la arteria cólica media. Aproximadamente unos 5-10 cm de intestino delgado se resecan para asegurar un flujo sanguíneo adecuado al íleo terminal.

- La hemicolecotomía derecha extendida o ampliada: se reserva para lesiones localizadas desde el colon proximal a la mitad del colon transverso. En esta técnica, además de lo mencionado para la hemicolecotomía derecha, se reseca también el colon transverso y, si es preciso, también el ángulo esplénico (según la localización de la lesión); posteriormente se liga la arteria cólica media en su origen, en lugar de únicamente su rama derecha. Tras la resección, el flujo vascular se sustenta por la rama ascendente de la arteria cólica izquierda y la circulación colateral.

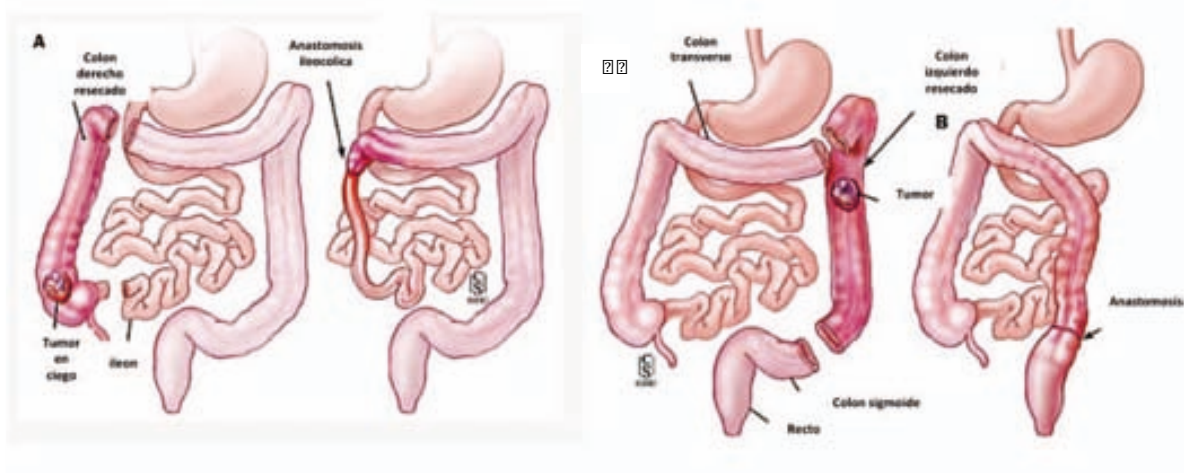


Figura 6. Cirugía del cáncer de colon. A: hemicolecotomía derecha; B: hemicolecotomía izquierda

- La hemicolectomía izquierda: es la técnica quirúrgica de elección para lesiones localizadas entre el colon descendente y sigma. En este procedimiento se resecan al menos 5 cm proximales a la lesión hasta el sigma o la unión rectosigmoidea. Se realiza ligadura y resección de la arteria y vena mesentérica inferior en su origen, para asegurar una cirugía radical. También es posible realizar una hemicolectomía izquierda ampliada para tumores del ángulo esplénico; en esta intervención se realizaría una ligadura de la arteria cólica izquierda [85].

1.1.6.1.2.- Cirugía del cáncer de recto

En el cáncer de recto el tipo de cirugía también depende de la localización del tumor. Para los tumores de recto del tercio superior o de la unión recto sigmoidea se realiza la resección anterior alta de recto (RAA). Sin embargo, para los tumores del recto medio y para algunos del tercio inferior (altos) se realiza una resección anterior baja (RAB). Dentro de los tumores del tercio inferior bajos, dependiendo de la distancia al esfínter, se realizan distintas técnicas: para tumores en la región supra-anal (distancia mayor de 1cm) se realiza resección anterior ultra baja (RAuB) con anastomosis colo-anal convencional; para los tumores yuxta-anales se realiza una RAuB con resección parcial interesfentérica; para los tumores intra-anales se realiza RAuB con resección total interesfentérica, y para los tumores transanales o tumores más distales se realiza la amputación o resección abdominoperineal (AAP u operación de Miles). En la resección abdominoperineal no existe la

Introducción

posibilidad de anastomosis debido a la insuficiente cantidad de recto distal y se realiza un colostomía permanente.

Una parte fundamental de la cirugía del cáncer de recto es la escisión total del mesorrecto que consiste en la extirpación en bloque del tumor y el correspondiente mesorrecto, asegurando unos márgenes adecuados y una correcta linfadenectomía [86]. El margen radial circunferencial se considera el más importante y se asocia con la probabilidad de recidiva y la supervivencia, considerándose positivos márgenes <1 mm [87].

En la actualidad el uso de la técnica laparoscópica está bien establecido tanto para las cirugías de colon como de recto. Cuatro ensayos clínicos prospectivos, COST, CLASSICC, COLOR y Barcelona han demostrado la utilidad de esta técnica y los beneficios sobre la cirugía abierta convencional en CCR [88-91]. Estos ensayos han demostrado de una forma consistente y uniforme que este tipo de abordaje quirúrgico es al menos no inferior al abordaje abierto convencional y además se ha asociado con una reducción significativa de la necesidad del uso de analgesia, la estancia hospitalaria y una recuperación más rápida de la función intestinal.

1.1.6.2.- Tratamiento Quimioterápico

1.1.6.2.1.- Quimioterapia adyuvante

La quimioterapia adyuvante consiste en la administración sistémica de fármaco/s tras la resección del tumor primario, y su objetivo fundamental es la eliminación de células tumorales residuales que pueden persistir tras la cirugía para reducir la probabilidad de recaída del tumor.

La quimioterapia adyuvante para el cáncer de colon demostró por primera vez su capacidad para reducir el riesgo de muerte en un artículo publicado en 1990 en el *New England Journal of Medicine*. En este artículo Moerter *et al.* reportaron que un año de tratamiento con el inmunomodulador levamisol y 5-fluorouracil (5-Fu) en pacientes con estadio C en la clasificación de Dukes reducía la recurrencia un 41% y el riesgo de muerte un 33%. La supervivencia estimada a los 3.6 años fue del 71% en la rama de pacientes que recibieron quimioterapia frente a un 55% en la rama de pacientes que fueron randomizados a observación [92, 93] . Así, a principios de los años 90 el tratamiento con 5-Fu era ampliamente recomendado tras la resección de un cáncer de colon estadio III. Posteriormente diferentes estudios demostraron que 6 meses de tratamiento con 5-Fu eran equivalentes en supervivencia libre de progresión y en supervivencia global al tratamiento administrado durante un año [94] y el leucovorín (LV) reemplazó al levamisol [95]. La infusión continua de 5-Fu en contraposición a la administración en bolus se erigió como estándar, tras la publicación de los resultados de un ensayo randomizado fase III en el que se demostró una eficacia similar a la de los estudios publicados con menor toxicidad en la rama de la administración continua [96]. Las toxicidades

Introducción

limitantes de dosis del 5-Fu son la diarrea, la mucositis y la toxicidad hematológica.

La capecitabina, una fluoropirimidina oral, se utiliza en la actualidad como alternativa a la infusión continua de 5-Fu [97]. La toxicidad derivada de la administración de capecitabina es similar a la del 5-Fu pero además presenta un efecto secundario característico que consiste en un eritema cutáneo localizado fundamentalmente en las palmas de las manos y las plantas de los pies conocido como síndrome palmo-plantar.

Posteriormente a la introducción del 5-Fu como tratamiento adyuvante, el estudio MOSAIC evaluó la adición de oxaliplatino (derivado del platino de tercera generación) a la combinación de 5-Fu/LV (esquema FOLFOX) como tratamiento adyuvante. En este estudio se demostró que el esquema FOFLOX era superior a 5-Fu/LV y aumentaba la supervivencia libre de progresión a 5 años de 67.4 a 73.3%. Este trabajo incluyó tanto pacientes estadio II como III, pero el análisis de subgrupos demostró que este beneficio solamente se producía en los pacientes con estadio III [98]. Otros dos ensayos clínicos han demostrado también que la adición de oxaliplatino a 5-Fu/LV mejora la supervivencia de pacientes con estadio III [99, 100].

El papel de la quimioterapia adyuvante en los estadios II continua siendo debatido [101]. Existen subgrupos de pacientes con estadio II que presentan un peor pronóstico que otros dentro del mismo estadio y son considerados de alto riesgo. En estos casos, existe casi uniformidad de las guías terapéuticas a la hora de recomendar quimioterapia adyuvante a pacientes que son considerados de alto riesgo (Tabla 5). En los estadios II, el oxaliplatino no ha

demostrado aumentar la supervivencia en diferentes ensayos clínicos randomizados, por lo que su uso no está recomendado en la mayoría de guías para los estadios II [98].

La presencia de MSI ha sido asociada a un mejor pronóstico y a una resistencia al 5-Fu y actualmente existen grupos que no recomiendan tratamiento adyuvante en tumores estadio II con MSI [68, 102, 103].

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE ALTO RIESGO EN ESTADIOS II DE COLON
<ul style="list-style-type: none"> • Lesión T4 en la clasificación TNM
<ul style="list-style-type: none"> • Perforación u oclusión forma inicial de presentación
<ul style="list-style-type: none"> • Grado histológico pobremente diferenciado
<ul style="list-style-type: none"> • Margen quirúrgico afecto
<ul style="list-style-type: none"> • Invasión linfovascular
<ul style="list-style-type: none"> • Invasión perineural
<ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de menos de 12 ganglios linfáticos

Tabla 5. Características de los tumores estadio II de alto riesgo

1.1.6.2.2- Quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de recto

El riesgo de recaída en estadios II y III de recto tras la resección quirúrgica exclusiva es del 25-70%. Numerosos estudios han evaluado la eficacia del tratamiento con quimioterapia y radioterapia y la combinación de ambas de forma adyuvante a la cirugía [104-108]. De estos estudios se desprende que la radioterapia aumenta el control local y la quimioterapia la supervivencia al reducir las recaídas a distancia.

La posibilidad de reducir el estadio inicial de los pacientes, de incrementar las posibilidades de preservación del esfínter y mejorar la resecabilidad fueron los principales motivos para evaluar en diversos ensayos clínicos el tratamiento con quimioterapia y radioterapia concomitantes administradas de manera previa a la cirugía. El estudio francés FFCD 9203 evaluó el papel de la quimiorradioterapia con 5-Fu/LV versus la radioterapia sola de forma neoadyuvante en pacientes con adenocarcinoma de rectoresecable T3-T4Nx, que tras la cirugía recibieron 4 ciclos más de 5-Fu/LV. El grupo tratado con quimiorradioterapia neoadyuvante presentó una disminución significativa en el número de recaídas locales en comparación al grupo tratado con radioterapia solamente (8.1% vs 16.5%; $p=0.004$); sin embargo, esta diferencia no se tradujo en un aumento de la supervivencia [109]. El estudio randomizado de cuatro ramas de la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 22941, evaluó la RT neoadyuvante vs la quimiorradioterapia neoadyuvante con 5-Fu vs radioterapia preoperatoria seguida de quimioterapia adyuvante vs la quimiorradioterapia preoperatoria seguida de quimioterapia adyuvante. En este complejo estudio la recurrencia locorregional se redujo en

los pacientes tratados con quimioterapia independientemente de cuando fuese administrada. Sin embargo, no se demostró un aumento de la supervivencia o de la supervivencia libre de progresión para ninguno de los brazos del estudio [110]. Un análisis posterior demostró que los pacientes con respuesta ypT0-2 tras la terapia neoadyuvante se beneficiaban de recibir quimioterapia adyuvante [111]. Dos estudios compararon de forma directa la administración de quimiorradioterapia de forma pre o postoperatoria. En el estudio de Sauer *et al.* no se observaron diferencias significativas en la supervivencia global, sin embargo sí se observaron diferencias en el riesgo de recaída local (6% vs 13%; $p=0.006$) y un aumento del ratio de preservación del esfínter (39% vs 19%; $p=0.004$) en la rama de quimiorradioterapia preoperatoria [112, 113]. El estudio NSABP-R03 comparó el tratamiento con quimioterapia de inducción seguida de quimiorradioterapia neoadyuvante versus quimiorradioterapia adyuvante. En este estudio se demostró una mayor supervivencia libre de progresión (64.7% vs 53.4%; $p=0.011$) y una tendencia hacia una mayor supervivencia global (74.5% vs 65.6%; $p=0.065$) en la rama de pacientes tratados de forma neoadyuvante. En este estudio, los autores destacan el hecho de que ninguno de los pacientes que presentó respuesta patológica completa (15%) tras la quimiorradioterapia (ypCR), presentó recaída de la enfermedad [114].

La capecitabina es también una alternativa a la infusión continua de 5-Fu para el tratamiento neoadyuvante en cáncer de recto [115] y es el tratamiento de elección en muchos centros en la actualidad. Además, algunos estudios han

Introducción

propuesto una mayor capacidad de radiosensibilización a la radioterapia en comparación con el 5-Fu [116].

La adición de oxaliplatino a las fluoropirimidinas no ha demostrado mayor supervivencia pero sí mayores toxicidades grado 3-4 [117, 118]. Un estudio reciente del grupo alemán CAO/ARO/AIO-04, ha reportado una tasa superior de respuestas patológicas en la rama de los pacientes tratados con oxaliplatino y flouropirimidinas comparado con los pacientes tratados sólo con fluoropirimidinas a expensas de una mayor toxicidad. Recientemente se han conocido los resultados de supervivencia libre de progresión (SLP) en los que la rama con oxaliplatino presenta una ventaja frente a la rama sólo con 5-Fu (SLP a 3 años 71.2% vs 75.9%, $p=0.03$). Los resultados de supervivencia global (SG) están a la espera de un mayor seguimiento [119-121]. Sin embargo, y también recientemente, otro estudio no ha encontrado diferencias en SLP con la adición de oxaliplatino a la quimiorradioterapia neoadyuvante cuando el fármaco empleado es la capecitabina (SLP a 3 años 74.5% vs 73.9%, $p=0.781$) [122].

1.1.7.- Tratamiento de la enfermedad diseminada o metastásica

Aproximadamente un 20-25% de los pacientes presenta al diagnóstico metástasis a distancia. Algunos pacientes con metástasis hepáticas o pulmonares podrán ser curados mediante un tratamiento multidisciplinar que incluirá cirugía +/- quimioterapia. Sin embargo, el tratamiento de la mayoría de los pacientes con enfermedad diseminada tiene como finalidad prolongar la supervivencia y paliar los síntomas derivados de la enfermedad.

En la pasada década el desarrollo de combinaciones de quimioterápicos además de la adición de nuevas terapias biológicas revolucionó el tratamiento del CCR metastático (CCRm). En la década de los 90 donde el único citotóxico utilizado para el tratamiento en la enfermedad metastásica era el 5-Fu, la supervivencia mediana de los pacientes con CCRm era aproximadamente de 12 meses. Sin embargo en la actualidad esta mediana ha aumentado hasta los 31 meses. La combinación de 5-Fu en infusión continua/LV (régimen de Gramont) es todavía la base de la quimioterapia en CCR [123]. En CCRm, la capecitabina también representa una alternativa a la administración endovenosa de 5-Fu [124, 125].

El irinotecan es un inhibidor de la topoisomerasa I y fue añadido al arsenal terapéutico en CCRm tras demostrar aumentar la supervivencia en combinación con 5-Fu/LV en bolus (régimen IFL) y en infusión continua (régimen FOLFIRI) [126-128]. El régimen FOLFIRI se asoció con una mayor respuesta (35% vs 22%; $p=0.005$), mayor SLP (6.7 vs 4.4 meses; $p<0.001$) y SG (17.4 vs 14.1 meses; $p=0.031$) [127].

Introducción

El oxaliplatino demostró por primera vez añadir beneficio al 5-Fu/LV en un ensayo clínico randomizado que comparó FOLFOX (oxaliplatino, 5-Fu/LV) con 5-fu/LV en monoterapia. En este estudio se demostró una mayor tasa de respuestas (50.7% vs 22.3%; $p=0.0001$), mayor SLP (9.0 v 6.2 meses; $p=.0003$) para la rama de FOLFOX pero similar SG (16.2 v 14.7 meses; $p=0.12$) [129].

FOLFIRI y FOLFOX son considerados tratamientos estándar de primera línea en el cáncer colorrectal. El grupo GERCOR llevó a cabo un ensayo para determinar la mejor secuencia en primera y segunda línea de estos esquemas. En este estudio la mediana de SG fue de 21,5 meses para la secuencia FOLFIRI→FOLFOX y de 20,6 meses para FOLFOX→FOLFIRI demostrando que ambos esquemas son equivalentes en primera línea[117]. Las diferencias fundamentales entre estos dos esquemas se dan en los diferentes perfiles de toxicidad grado 3-4. La toxicidad característica que define al oxaliplatino es la neurotoxicidad, mientras que las toxicidades limitantes de dosis del irinotecan son la diarrea y la neutropenia.

La capecitabina en combinación con irinotecan o con oxaliplatino en lugar de la infusión continua de 5-Fu ha demostrado su eficacia en varios ensayos clínicos y es considerada como una alternativa terapéutica[130, 131].

El desarrollo de los nuevos fármacos biológicos ha contribuido de forma importante a la mejora en la supervivencia de los pacientes con CCRm. Estos fármacos pueden agruparse en dos tipos: aquellos que actúan inhibiendo la vía del factor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a nivel de

su receptor conocidos como anti-EGFR (cetuximab y panitumumab) y, aquellos que actúan fundamentalmente como inhibidores de la generación de nuevos vasos sanguíneos, fenómeno conocido como angiogénesis (bevacizumab, aflibercept y regorafenib).

Los fármacos anti-EGFR aprobados para el tratamiento del CCRm son el cetuximab y el panitumumab. Ambos fármacos son anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de los ligandos naturales al receptor del EGF impidiendo así la cascada de señalización que da lugar a la activación de la proliferación celular. Aproximadamente un 40% de los pacientes con CCRm presentan mutaciones en el gen de *KRAS* situado en la vía de señalización del EGFR y no presentan respuesta a los anticuerpos anti-EGFR. Recientemente también las mutaciones en el gen *NRAS* han demostrado predecir la falta de respuesta a estos fármacos. La vía de señalización EGFR y las mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* son discutidas en el apartado 1.2. La toxicidad más característica de los tratamientos anti-EGFR es la aparición de un rash cutáneo de tipo acneiforme, que se localiza fundamentalmente en cara y tronco. Este rash aparece en la mayoría (90%) de los pacientes tratados con cetuximab o panitumumab aunque sólo en el 17-36% de las ocasiones es grave. Otros efectos adversos característicos de los fármacos anti-EGFR son la diarrea y la hipomagnesemia.

El cetuximab (Erbix®), Merck) es un anticuerpo monoclonal quimérico humano-ratón IgG1. En primera línea de cáncer colorrectal metastático el estudio CRYSTAL evaluó la adición de cetuximab a FOLFIRI. En este estudio, y tras analizar de manera retrospectiva la presencia de mutaciones en el exon

Introducción

2 del gen *KRAS*, se demostró un aumento de la tasa de respuestas (57.3% vs 39.7%; $p < 0.001$), la SLP (9.9 v 8.4 meses; $p = 0.0012$) y la SG (23.5 v 20.0 meses; $p = 0.0093$) en la rama de cetuximab, así como un aumento en la tasa de resección de lesiones metastásicas con una intención curativa [75]. El papel de cetuximab en combinación con FOLFOX en primera línea fue evaluado por el ensayo fase II randomizado OPUS en el que la rama de FOLFOX-cetuximab demostró ser superior a FOLFOX en tasa de respuestas (57% vs 64%; $p = 0.049$) y en SLP también en el subgrupo de pacientes con *KRAS* nativo (7.7 vs 7.2 meses; $p = 0.02$) [132]. También en primera línea y en combinación con regímenes basados en oxaliplatino, el estudio británico COIN evaluó cetuximab con FOLFOX o CapeOX (capecitabina + oxaliplatino) reportando un aumento en la tasa de respuestas en los pacientes con *KRAS* nativo pero no en la SLP o SG [133].

En segunda línea de tratamiento, tres estudios fase III randomizados han evaluado la eficacia de cetuximab. De ellos sólo el estudio en tercera o líneas posteriores de cetuximab frente al mejor tratamiento de soporte analizó el estado de *KRAS* y fue el único en reportar un aumento en la SG (9.5 vs 4.8 meses; $p < 0.001$) [134]. Los otros dos estudios que evaluaron la eficacia de cetuximab en segunda línea ambos en combinación con irinotecan, demostraron un aumento en la tasa de respuestas y en la SLP pero no en la SG, aunque el estado de *KRAS* no fue analizado [135, 136].

El panitumumab (Vectivix®, Amgen) es un anticuerpo IgG2 completamente humanizado. En el estudio pivotal en primera línea PRIME, la adición de panitumumab a FOLFOX en pacientes con *KRAS* nativo demostró un aumento

de la SLP (9.6 vs 8.0 meses; $p= 0.02$) y la SG (23.8 vs 19.4 meses; $p= 0.03$) [137, 138]. Un posterior análisis de mutaciones en otros exones de del gen *KRAS* y en el gen *NRAS*(análisis extendido de Ras: *KRAS* codones 3 y 4 y codones 2, 3, 4 del gen *NRAS*) aumentó el beneficio en supervivencia para los pacientes sin ninguna mutación en Ras en la rama de panitumumab (26.0 vs 20.2 meses; $p=0.04$) [139, 140]. En segunda línea, panitumumab fue evaluado en un estudio fase III en combinación con FOLFIRI demostrando, tras la evaluación de las mutaciones del generas, un aumento en la tasa de respuestas (35% vs 10% ; $p<0.001$) y en la SLP (5.9 vs 3.9 meses; $p= 0.004$) pero no en la SG (14.5 vs 12.5 meses; $p= 0.12$)[141]. También en segunda línea y en pacientes sin mutación en *KRAS* el estudio PICOLO evaluó la combinación de FOLFOX–panitumumab frente a FOLFOX sin poder demostrar un beneficio en SG pero sí en tasa de respuesta (34 vs 12%; $p<0.0001$) y la SLP [142]. En pacientes refractarios en progresión a los tratamientos estándar panitumumab también ha mostrado eficacia en comparación con el mejor tratamiento de soporte en pacientes sin mutación del gen *KRAS* [143, 144].

Recientemente se han reportado los resultados del análisis de Ras extendido en varios estudios tanto con cetuximab como con panitumumab y todos demuestran una falta de respuesta a los tratamientos con anti-EGFR en pacientes con mutaciones en *NRAS* [142, 145-147].

Introducción

Las moléculas dirigidas frente a la angiogénesis aprobadas en Europa para el tratamiento del CCRm incluyen:

El bevacizumab (Avastin®, Genetech) es un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A). El VEGF-A es uno de los ligandos activadores del receptor VEGF, cuya unión desencadena una cascada de señalización que da lugar a la activación de genes implicados en la angiogénesis. Los efectos adversos más comunes de la administración de bevacizumab incluyen la hipertensión arterial y la proteinuria; otros menos frecuentes son el incremento de los eventos tromboembólicos, hemorragias y perforación intestinal.

En primera línea del tratamiento de CCRm, en un estudio randomizado inicial, la adición de bevacizumab a IFL (bolus 5-Fu y leucovorin) resultó en un aumento de la tasa de respuestas (44.8% vs 34.8%, $p=0.004$), la SLP (10.6 meses vs 6.2 meses, $p<0.001$) y la SG (20.3 meses vs 15.6 meses, $p<0.001$) para el brazo con bevacizumab, lo que supuso la aprobación por la FDA y la EMA de bevacizumab en combinación con fluorouropirimidinas para el tratamiento del CCRm [148]. Otros estudios también han mostrado un aumento de la SLP y la respuesta para la adición de bevacizumab a bolus 5-Fu/LV [149]. Posteriormente, la adición de bevacizumab a otros esquemas citotóxicos no ha demostrado el beneficio esperado tras los resultados del estudio pivotal. El ensayo clínico fase III que evaluó en un diseño 2 x 2 FOLFOX vs CapeOX + bevacizumab y FOLFOX vs Capeox demostró un beneficio en SLP para la adición de bevacizumab pero no para la tasa de respuestas ni la SG [150]. No existe ningún ensayo clínico randomizado que evalúe la combinación de

FOLFIRI con bevacizumab en primera línea. El estudio de uso expandido BEAT mostró una mediana de SLP de 11.6 meses y de 23.7 meses para OS en los pacientes tratados con bevacizumab-FOLFIRI [151].

En una segunda línea de tratamiento en CCRm, el estudio randomizado de tres ramas E3200 que comparó FOLFOX-bevacizumab vs FOLFOX vs bevacizumab en monoterapia, fue cerrado tras un primer análisis interino que demostró una mayor supervivencia en la rama de FOLFOX-bevacizumab y una falta de eficacia en la rama de bevacizumab en monoterapia con un ratio de respuestas del 3.3% [152]. En cuanto a la combinación con irinotecan en segunda línea hasta la fecha no existe ningún ensayo clínico fase III evaluando la combinación con bevacizumab aunque varios estudios fase II ha demostrado su eficacia[153].

El ensayo clínico randomizado FIRE-3 evaluó por primera vez cetuximab frente a bevacizumab en primera línea en combinación con FOLFIRI en pacientes con KRAS nativo. En este estudio, cuyo objetivo principal era evaluar la tasa de respuestas, no se encontraron diferencias significativas ni en respuesta ni en SLP pero sí en la SG favoreciendo a la rama con cetuximab (28.7 vs 25.0 meses, $p=0.017$) [154].

Aflibercept (Zaltrap®, Sanofi) es una proteína de fusión recombinante diseñada para bloquear la actividad de VEGF-A, VEGF-B y el factor de crecimiento de la placenta (PIGF). El estudio VELOUR demostró un ligero aumento de la supervivencia para los pacientes tratados con Aflibercept-FOLFIRI en segunda línea frente a FOLFIRI solo (13.5 vs 12.6 meses; $p=0.0032$) [155]. Al igual que

Introducción

con bevacizumab el efecto adverso más común en este estudio fue el desarrollo de hipertensión.

Regorafenib (Stivarga®, Bayer) es un inhibidor de múltiples kinasas implicadas en la angiogénesis como VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, TIE2; en la oncogénesis como KIT, RET, RAF1, BRAF, y en microambiente tumoral como PDGFR y FGFR. Este fármaco ha demostrado, en un estudio fase III frente a placebo, aumentar la supervivencia (6.4 vs 5.0 meses; $p=0.0052$) en pacientes tras progresión a todos los tratamientos estándar [156]. Las toxicidades más relevantes de regorafenib incluyen síndrome mano-pie, fatiga, diarrea, elevación de transaminasas e hipertensión.

1.2.- La vía del factor de crecimiento epidérmico y el cáncer colorrectal

La vía de señalización del EGFR tiene como finalidad promover la proliferación y supervivencia celular así como la migración y la angiogénesis, favoreciendo el crecimiento y el desarrollo tumoral. Esta vía es una de las más importantes en el desarrollo y en el tratamiento del cáncer colorrectal.

1.2.1.- La cascada de señalización

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) también conocido como HER1 pertenece a la familia de receptores tirosin quinasa ErbB. Los ligandos del EGFR con capacidad para iniciar la cascada de señalización tras su unión al receptor son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la anfiregulina (AREG), la epiregulina (EREG) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) [157]. Tras la unión de alguno de los ligandos al EGFR se produce la homo o heterodimerización del receptor seguida de su autofosforilación, iniciando así una cascada de señalización que en última instancia da lugar a la proliferación celular, la invasión, el desarrollo de metástasis y la apoptosis celular. Estos procesos ocurren mediante la activación de dos nuevas vías: i) la cascada Ras/Raf/MAPK y ii) la cascada PI3K/proteína quinasa B (AKT)/mTOR. La primera, se inicia con la activación de Ras mediante el factor intercambiador del nucleótido de guanina. Ras activado induce la activación de Raf que, a su vez, iniciará la fosforilación de las proteína-quinasa MAPKs. Las MAPKs son traslocadas al núcleo donde

Introducción

regulan la transcripción de factores que favorecen la supervivencia y la proliferación celular [158, 159]. En la cascada PI3K/proteína quinasa B (AKT)/mTOR, cuando EGFR es activado la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato 3-quinasa (PI3K) es fosforilada a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). La función de PIP3 es antagonizada por la proteína PTEN. La forma activa de PIP3 es capaz de fosforilar la proteína quinasa B (AKT) que, a su vez, tendrá la capacidad de fosforilar múltiples sustratos. AKT promueve la proliferación celular al regular de forma negativa el supresor tumoral p53 [160]. Además, AKT activa el complejo de la diana molecular de la rapamicina en mamíferos (mTOR) a través de la regulación negativa de las proteínas del complejo de esclerosis tuberosa 1 (TSC1) y TSC2 (Figura 7). Estas dos cascadas interaccionan a su vez con otras vías de señalización lo que contribuye a la auto-regulación de la vía, pero también probablemente a la aparición de resistencias a los fármacos dirigidos frente a estas vías [161].

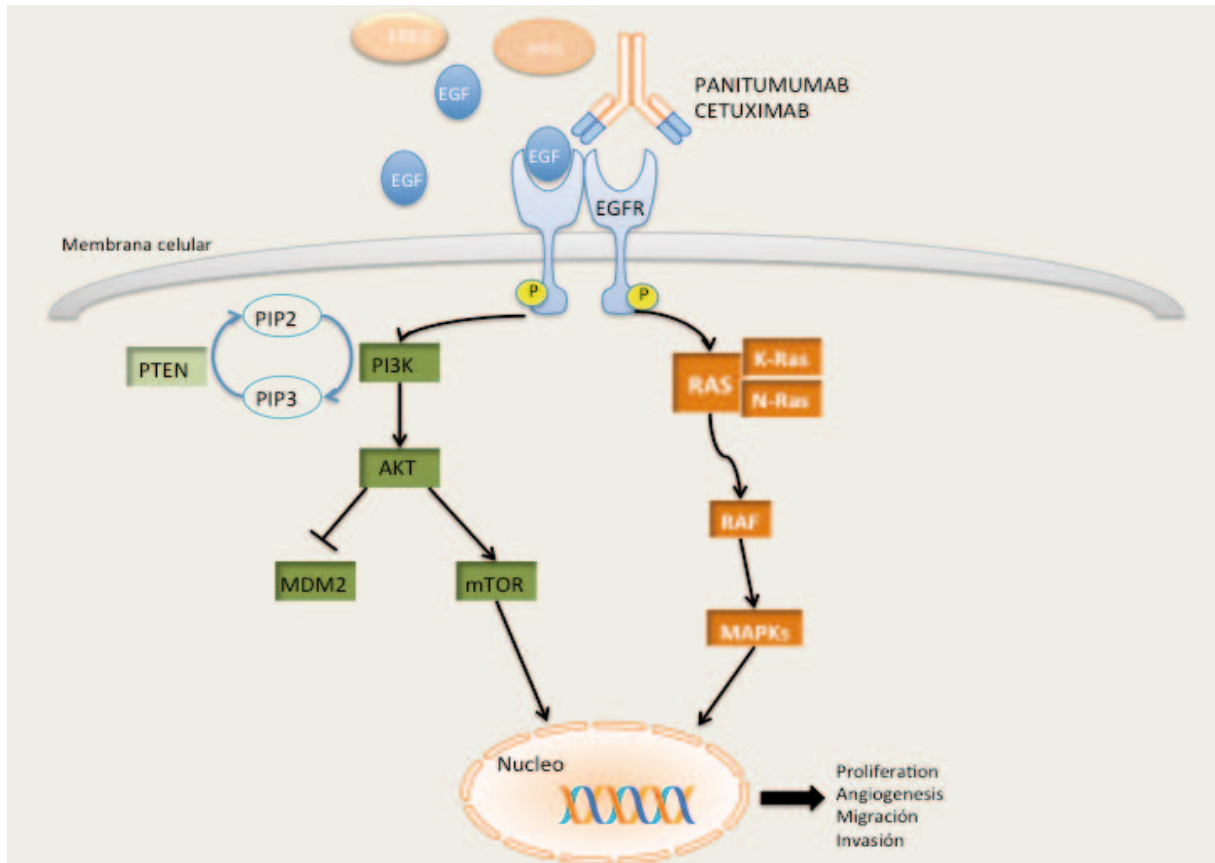


Figura 7. Esquema de la vía de señalización del EGFR

1.2.2.- Biomarcadores en la vía del EGFR

1.2.2.1.- Mutaciones somáticas

Mutaciones en el gen *KRAS*. Las mutaciones en este gen fueron los primeros biomarcadores de respuesta descubiertos para las terapias anti-EGFR en CCR.

El oncogen *KRAS* codifica para la proteína GTP-asa *KRAS* que se encuentra mutada en un 30-40% de los tumores colorrectales [162]. En condiciones celulares normales, la actividad del gen *KRAS* nativo está altamente regulado y

presenta escasa activación. Cuando existe una mutación activadora, KRAS está activado de forma constitutiva y sus cascadas de señalización RAS/RAF/MEK/MAPK y PI3K/AKT permanecen también activas. La mayoría de las mutaciones en *KRAS* se encuentran en los codones 12 y 13 del exón 2 pero también pueden existir en los exones 3 y 4 [163] (Figura 8). Numerosos estudios han confirmado los hallazgos preliminares de Lievre *et al.* que indicaban que los pacientes con mutaciones en el gen *KRAS* no respondían al tratamiento con cetuximab [164] como ha sido discutido en el apartado 1.1.7.

De Rook *et al.* realizaron un estudio retrospectivo exploratorio en el que demostraron que los pacientes con mutaciones del gen *KRAS* en el codón 13, tenía mejor respuesta, SLP y OS que los pacientes con mutaciones de *KRAS* localizadas en otros codones [165]. Este hecho puede ser debido a que dichas mutaciones (fundamentalmente G13D) tienen una menor actividad oncogénica. Sin embargo, en cuanto al tratamiento con panitumumab, este dato no ha podido ser corroborado [166].

Mutaciones en el gen *NRAS*. Las mutaciones en el gen *NRAS* son menos frecuentes que en el gen *KRAS* (Figura 8) y su coexistencia es excepcional [142].

Mutaciones en el gen *BRAF*. Como ha sido discutido en el apartado 1.1.5.2, la mutación V600E del gen *BRAF* está considerada un factor de mal pronóstico independiente del tratamiento. Sin embargo, no se ha demostrado que tenga papel como factor predictivo de respuesta a los tratamientos anti-EGFR [167-169].



Figura 8. Frecuencia y localización de las mutaciones en Ras y BRAF

Adaptada de Heinemann et al. ESMO Congress, Amsterdam 2013.

Mutaciones en PI3KCA. Los datos referentes al valor de las mutaciones en PI3KCA como factores predictivos de respuesta para los tratamientos anti-EGFR son contradictorios. A modo de ejemplo, Sartore-Bianche *et al.* demostraron la falta de respuesta a anti-EGFR en pacientes con mutaciones en este gen [170], mientras que Prenen *et al.* tras analizar 200 muestras de pacientes con cáncer colorrectal no encontraron ninguna correlación entre estas mutaciones y la respuesta a cetuximab [171].

1.2.2.2.- Otros biomarcadores moleculares

En la vía del EGFR se han evaluado otros biomarcadores como factores predictivos de respuesta a fármacos anti-EGFR:

Silenciamiento del gen PTEN. El gen PTEN es un enzima tirosin fosfatasa que funciona como un regulador negativo de la vía PI3K/AKT. Las mutaciones en el gen PTEN son infrecuentes y se encuentran asociadas a tumores con alta MSI. La hipermetilación del promotor de PTEN que es frecuente en tumores con alta MSI, es la causa más frecuente de silenciamiento del gen PTEN. Algunos estudios han encontrado una correlación entre la falta de expresión de PTEN y la supervivencia en los pacientes con cáncer colorrectal metastático tratados con anti-EGFR [168]. Sin embargo, datos recientes no corroboran estos hallazgos [172].

La sobreexpresión de EGFR. Un 50-70% de los carcinomas colorrectales presenta sobreexpresión del EGFR. Sin embargo, la expresión de EGFR en el tumor medida mediante técnicas de inmunohistoquímica, no se asocia con la respuesta a tratamientos anti-EGFR [173].

Los niveles de expresión de anfiregulina y epiregulina. Los niveles de estos ligandos del EGFR también han sido correlacionados con la respuesta al tratamiento con cetuximab. En un estudio que incluyó 220 pacientes con CCRm refractarios a tratamiento con irinotecan y tratados con cetuximab, los pacientes sin mutación de *KRAS* y con niveles altos de expresión de anfiregulina y epiregulina presentaron una mayor SLP y una mayor OS [174]. En otro estudio, que evaluó 110 pacientes incluidos en un ensayo clínico de cetuximab en

monoterapia, se analizaron los perfiles de expresión de anfiregulina y epiregulina describiéndose un mayor control de la enfermedad y SLP en pacientes con alta expresión [175].

1.2.2.3.- Biomarcadores clínicos

La toxicidad cutánea. La gran mayoría de los pacientes tratados con fármacos bloqueantes de la vía EGFR desarrollan toxicidad cutánea. Este efecto secundario se debe a la alta dependencia de que los queratinocitos tienen de la vía del EGFR para proliferar. El bloqueo de esta vía impide la maduración normal de los queratinocitos y favorece su apoptosis, dando lugar a xerosis y prurito [176]. El desarrollo de toxicidad grado 2 o superior se ha asociado a una mayor eficacia de los fármacos anti-EGFR. Un ejemplo de esta asociación es el estudio PRIME que valoró FOLFOX con o sin panitumumab en el que se reportó que los pacientes con KRAS nativo y toxicidad cutánea grado 2 o superior presentaban una mayor SLP y OS que los pacientes con una toxicidad cutánea grado 0-1 [177, 178].

La hipomagnesemia. El desarrollo de hipomagnesemia también ha sido evaluado de forma retrospectiva como un marcador predictivo de respuesta a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Sin embargo, los resultados hasta la fecha son contradictorios [179-181].

1.3.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer colorrectal

En este apartado se describen únicamente los estudios farmacogenéticos referentes al tratamiento con terapias anti-EGFR y aquellos estudios realizados en el contexto del tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado tratado con quimiorradioterapia.

1.3.1.- Estudios farmacogenéticos de las terapias anti-EGFR

1.3.1.1.- El gen *EGFR* y sus ligandos

El estudio de polimorfismos en los genes implicados en la cascada de señalización del EGFR ha sido objeto de numerosos trabajos. Fundamentalmente, estos trabajos se han centrado en el estudio de polimorfismos en el gen que codifica para el receptor (EGFR). En el gen *EGFR* se han descrito multitud de polimorfismos, entre ellos 4 funcionales que se asocian con la regulación del EGFR: i) una repetición del dinucleótido CA_(n) en el intrón 1 en el que la actividad transcripcional del EGFR es inversamente proporcional al número de repeticiones [182]; ii) un polimorfismo no sinónimo que afecta a la capacidad de unión de los ligandos al EGFR (Arg521Lys)[183]; iii-iv) dos polimorfismos en la región promotora (-216G>T y -191C>A) que afectan al sitio de unión de un factor de transcripción Sp1 [184].

En el ligando natural del EGFR, EGF, el polimorfismo mas estudiado se encuentra localizado en la región 5'UTR y consiste en un cambio de A>G en la posición 61 que afecta sus niveles de expresión.

No se han descrito polimorfismos funcionales en los otros ligandos del EGFR como anfiregulina o epiregulina.

En el contexto de CCRm, varios grupos han estudiado estos SNP como factores pronósticos o predictivos de respuesta a tratamientos basados en terapias anti-EGFR. En 2008, Graciano *et al.* evaluaron el valor de estos polimorfismos en una cohorte de 110 pacientes cuyo estado de la mutación de KRAS era desconocido, y que fueron tratados con irinotecan y cetuximab tras progresión a al menos una línea de tratamiento. En este estudio, pacientes con un genotipo con dos alelos con menos de 17 CA repeticiones en el intrón 1 del EGFR y un genotipo GG para el 61A>G polimorfismo en el gen EGF, presentaban una mayor SLP y una mayor SG [185]. Lurje *et al.* estudiaron polimorfismos en EGFR y EGF en una cohorte de 130 pacientes (con estado mutacional del gen KRAS desconocido) tratados con cetuximab en monoterapia y describieron una correlación entre el polimorfismo EGFR Arg521Lys y la SLP. En este estudio, los pacientes con el genotipo heterocigoto A/G presentaban una mayor SLP que los pacientes con genotipos G/G y A/A [186]. Hsieh *et al.* también describieron una relación entre este polimorfismo y la respuesta y la SLP en pacientes tratados con FOLFOX-cetuximab. En este estudio los pacientes con al menos un alelo A presentaban una menor respuesta y SLP que los pacientes homocigotos G/G [187]. Spindler *et al.* también estudiaron polimorfismos en el gen EGFR y EGF en pacientes con KRAS nativo tratados con irinotecan y cetuximab, y describieron una asociación entre el EGF 61 A>G y la supervivencia [188].

Introducción

Dahan y colaboradores evaluaron estos polimorfismos en un perfil similar de pacientes y reportaron una asociación entre el polimorfismo EGFR -191 C>A y el tiempo a la progresión [189].

De los resultados de estos estudios se desprende que el papel de estos polimorfismos en los genes *EGFR* y *EGF* no ha sido aclarado, ya que los resultados reportados por unos grupos no han podido ser reproducidos en otras cohortes.

En el contexto de cáncer de recto localmente avanzado, el valor de estos SNPs como biomarcadores ha sido menos estudiado. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que las radiaciones ionizantes pueden simular la acción de los ligandos de EGFR y, por lo tanto, iniciar la cascada de señalización de esta vía. Esta activación actuaría como un mecanismo de protección celular frente a la radioterapia. Zhang *et al.* evaluaron la asociación de varios polimorfismos en el gen *EGFR* y su relación con la probabilidad de recurrencia local tras cirugía y tratamiento neo o adyuvante en 53 pacientes con cáncer de recto. Estos autores reportaron una mayor probabilidad de recurrencia local para los pacientes con la combinación del genotipo EGFR 521 Arg/Arg y un número inferior a 20 de repeticiones CA en el intrón 1 del *EGFR* [190]. Spindler *et al.* evaluaron 77 pacientes con cáncer de recto localmente avanzado y describieron una mayor respuesta al tratamiento con quimiorradioterapia para los pacientes homocigotos G/G para el polimorfismo EGFR -216G>T comparado con los pacientes con genotipos con al menos un alelo mutado T [191].

El polimorfismo EGF 61A>G también se ha correlacionado con la respuesta al tratamiento con quimiorradioterapia y cetuximab en un estudio que incluyó 130 pacientes con cáncer de recto, en los que el genotipo EGF 61 G/G se asoció a una mayor probabilidad de respuesta completa patológica [192].

Al igual que en el contexto de CCRm, los resultados de estos estudios impiden a día de hoy la interpretación del verdadero papel de estos SNPs como biomarcadores de respuesta a quimiorradioterapia.

1.3.1.2.- Farmacogenética de la toxicidad mediada por anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales anti-EGFR además de proporcionar una actividad antitumoral mediante el bloqueo de su diana EGFR, también presentan una actividad antitumoral indirecta mediante un mecanismo de citotoxicidad mediada por células y dependiente del anticuerpo (ADCC). La porción Fc del anticuerpo se une a los receptores Fc (FcγR) en las células efectoras citotóxicas (macrófagos o natural killer) dando lugar a esta actividad antitumoral [193]. Las variaciones genéticas que afectan al receptor celular para la fracción constante de las inmunoglobulinas FcγRIIa y IIIa, (CD32 y CD16 respectivamente) pueden alterar este mecanismo citotóxico. Zhang *et al.* analizaron polimorfismos localizados en dichos receptores y reportaron que los polimorfismos FCGR2A-H131R y FCGR3A-V158F estaban asociados con la SLP en pacientes tratados con cetuximab en monoterapia [194]. Posteriormente, Bibeau *et al.* en una cohorte de pacientes tratados con irinotecan y cetuximab, confirmaron los resultados previos respecto al FCGR2A-H131R. Sin embargo, los resultados respecto al polimorfismo

Introducción

FCGR3A-V158F fueron contradictorios [195]. Páez *et al.* no evidenciaron ninguna relación entre estos dos polimorfismos y la SLP en pacientes tratados con irinotecan y cetuximab [196]. Muy recientemente, un estudio de un consorcio internacional no ha podido tampoco comprobar el valor de estas variantes genéticas [197].

1.3.1.3.- Farmacogenética de los micro RNA en la vía del EGFR

Los microRNA (miRNA) son una clase de ARN apenas modificado durante la evolución y no codificante, formado por 20-22 nucleótidos. Actúan como reguladores transcripcionales de la expresión génica. Su mecanismo de acción es a través de la unión a secuencias complementarias del mRNA diana para degradarlo o reducir su traducción (Figura 9). El funcionamiento incorrecto de estos miRNA puede dar lugar a la inadecuada inactivación de genes supresores tumorales como a la activación de oncogenes [198].

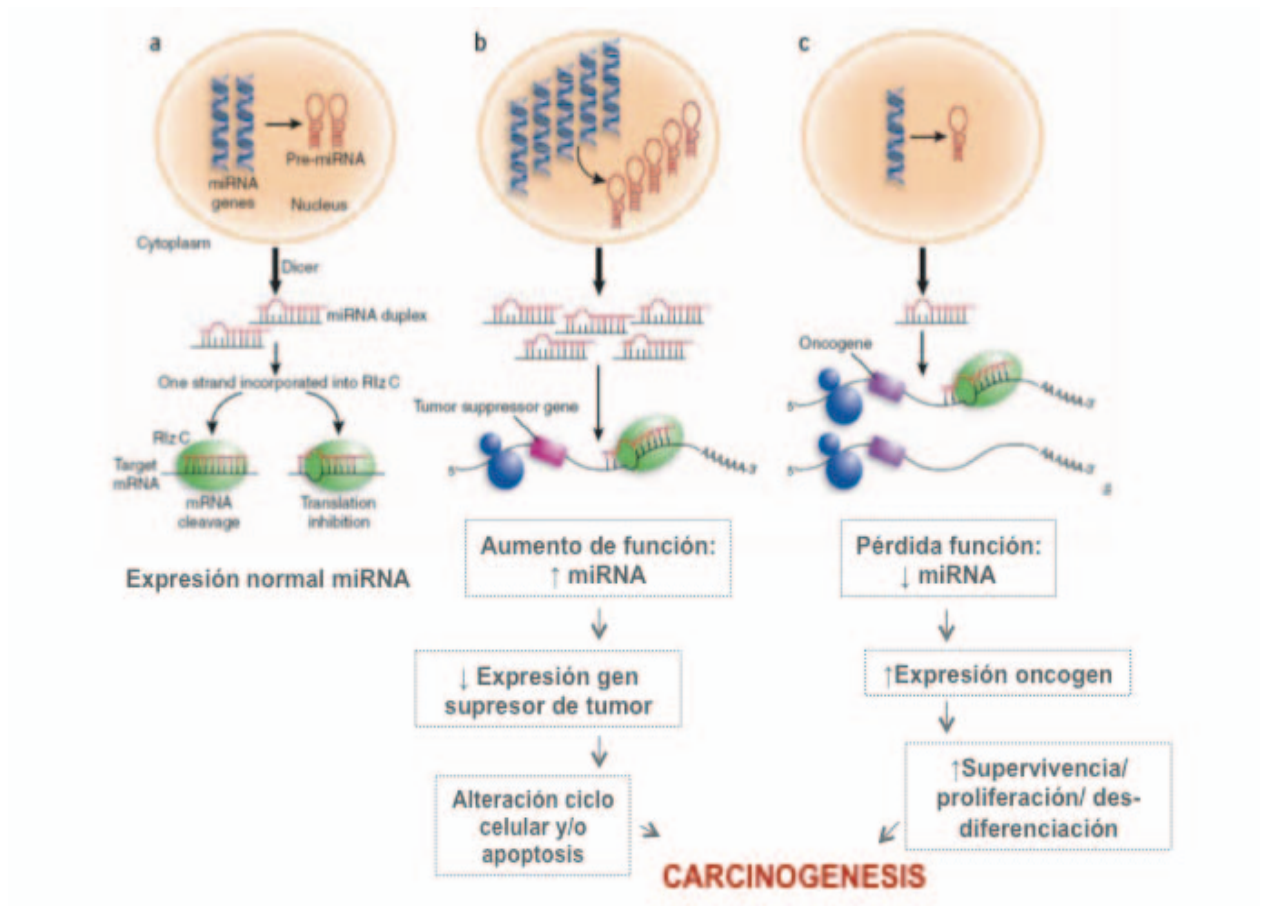


Figura 9. Contribución de los microRNA a la carcinogénesis

En los últimos años, numerosos estudios han implicado a los miRNA en múltiples procesos tanto en cáncer colorrectal como en otros tumores y enfermedades. En CCR, la familia de miRNA conocida como “lethal-7” (Let-7), ha sido una de las más estudiados. Consiste en 12 genes que codifican para nueve miRNA diferentes (let-7a – Let-7i). En modelos experimentales, líneas celulares de CCR transfectadas con Let-7a mostraron una supresión del crecimiento tumoral y una reducción en los niveles proteicos de KRAS con niveles invariables de mRNA. En la región 3’UTR del sitio de unión de Let-7a al gen KRAS, conocido como “sitio complementario de unión let-7 6” (LCS6), se ha descrito un polimorfismo que afecta a la unión del miRNA. Este polimorfismo

Introducción

consiste en un cambio de T>G que altera la afinidad de unión del miRNA let-7 que conllevaría una mayor expresión de KRAS [199, 200].

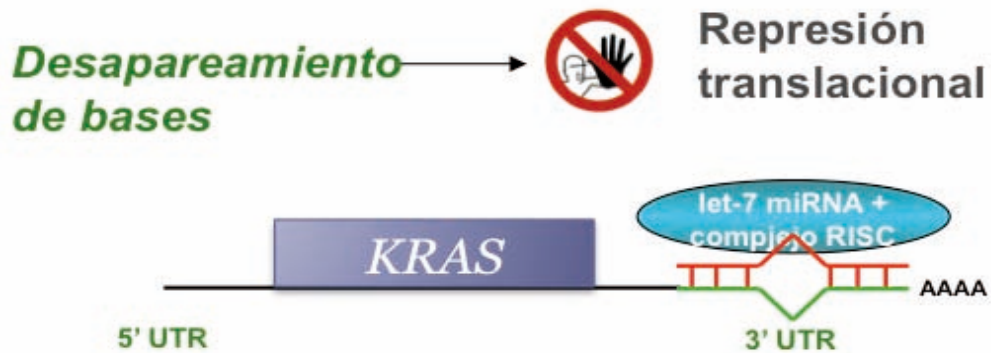


Figura 10. Mecanismo de acción del Let-7. El miRNA let-7 se une junto con el complejo RISC a la región 3'UTR del gen *KRAS* donde se localiza un sitio complementario de unión (LCS6) dando lugar a la represión translacional del gen *KRAS*.

El estudio de este polimorfismo en pacientes con cáncer colorrectal ha dado lugar a resultados discordantes. En CCR en estadios tempranos (I y II), la variante G del polimorfismo *KRAS* LSCS6 se asoció a un mejor pronóstico [201]. Sin embargo, en otro estudio posterior los autores describieron esta asociación en pacientes con estadios III y IV y no con estadios I y II [202]. Esta variante genética también ha sido estudiada en pacientes tratados con cetuximab con resultados contradictorios. Un grupo italiano estudió este polimorfismo en un grupo de pacientes afectos de CCRm refractario a al menos una línea de tratamiento y que recibieron irinotecan y cetuximab, y describieron

una relación entre la variante G del KRAS LCS6 y una peor SLP y SG en pacientes con KRAS nativo[203]. Sin embargo, pocos meses después un grupo estadounidense reportó la asociación contraria en un grupo de pacientes tratados con cetuximab en monoterapia [204].

Recientemente, un estudio que incluyó a 510 pacientes tratados con terapias anti-EGFR, reportó una mayor SLP para los pacientes KRAS y BRAF nativos con al menos un alelo G, tratados con cetuximab en monoterapia. Sin embargo, esta diferencia no se observó en los pacientes tratados con terapias anti-EGFR y quimioterapia. Un estudio realizado en líneas celulares mostró diferencias en el impacto de este polimorfismo en la expresión de KRAS dependiendo del tipo de tratamiento empleado [205]

Otros polimorfismos localizados tanto en las secuencias de unión de miRNAs como en las secuencias codificantes de estos miRNAs, han sido evaluados en estudios epidemiológicos [206-208].

1.3.2.- Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de recto con quimiorradioterapia basada en fluoropirimidinas.

A continuación se describen únicamente los estudios farmacogenéticos en el contexto del tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado tratado con quimiorradioterapia. Los quimioterápicos empleados en combinación con radioterapia son las fluorouropirimidinas, 5-Fu o capecitabina, y el oxaliplatino.

El mecanismo de acción de las fluoropirimidinas se basa en la inhibición de la timidilato sintetasa (TS), una enzima que cataliza la síntesis de ADN [209].

Introducción

Se han descrito diversos polimorfismos en el gen que codifica para la enzima TS y algunos modifican su expresión. Uno de ellos se encuentra localizado en la región 5'UTR, y consiste en una variación en el número de repeticiones de una secuencia formada por 28 pares de bases [210]. Los alelos más frecuentes en la población general contienen 2 o 3 repeticiones (2R o 3R) en tándem de dicha secuencia. Este número de repeticiones afecta los niveles de TS de forma que los alelos con 3 repeticiones presentan una mayor eficiencia traslacional que los alelos con dos repeticiones [211, 212]. Otro polimorfismo que altera la expresión de TS, consiste en un cambio de G por C en los pacientes que tiene tres repeticiones en el polimorfismo de la secuencia en tándem previamente descrita. Este cambio, da lugar a una alteración en el sitio de unión de un factor de transcripción, alterando así la actividad traslacional de la TS [213]. Combinando estos polimorfismos descritos podemos clasificar a los genotipos en: asociados a alta expresión (2R/3G; 3C/3G; 3G/3G) y asociados a baja expresión (2R/2R; 2R/3C; 3C/3C). Estos polimorfismos han sido evaluados como marcadores predictivos en el carcinoma de recto localmente avanzado tratado con quimiorradioterapia. En los estudios más antiguos, los pacientes con genotipo 2R presentaban una mayor respuesta al tratamiento con quimiorradioterapia preoperatorio [214, 215]. Sin embargo, estudios más recientes y con un mayor número de pacientes asociaron los genotipos 3R y aquellos de alta expresión con una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento neoadyuvante [216, 217]. Además del tratamiento con fluorouracil, el tratamiento multidisciplinar del cáncer de recto localmente avanzado incluye la radioterapia y, en

ocasiones, otros fármacos como el oxaliplatino. Los daños producidos por esos agentes son reparados mediante las vías de reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER) y la vía de reparación por escisión de bases (BER).

La vía NER repara los aductos que distorsionan la doble hélice de ADN [218].

La figura 11 esquematiza esta vía y muestra las principales proteínas implicadas en su funcionamiento.

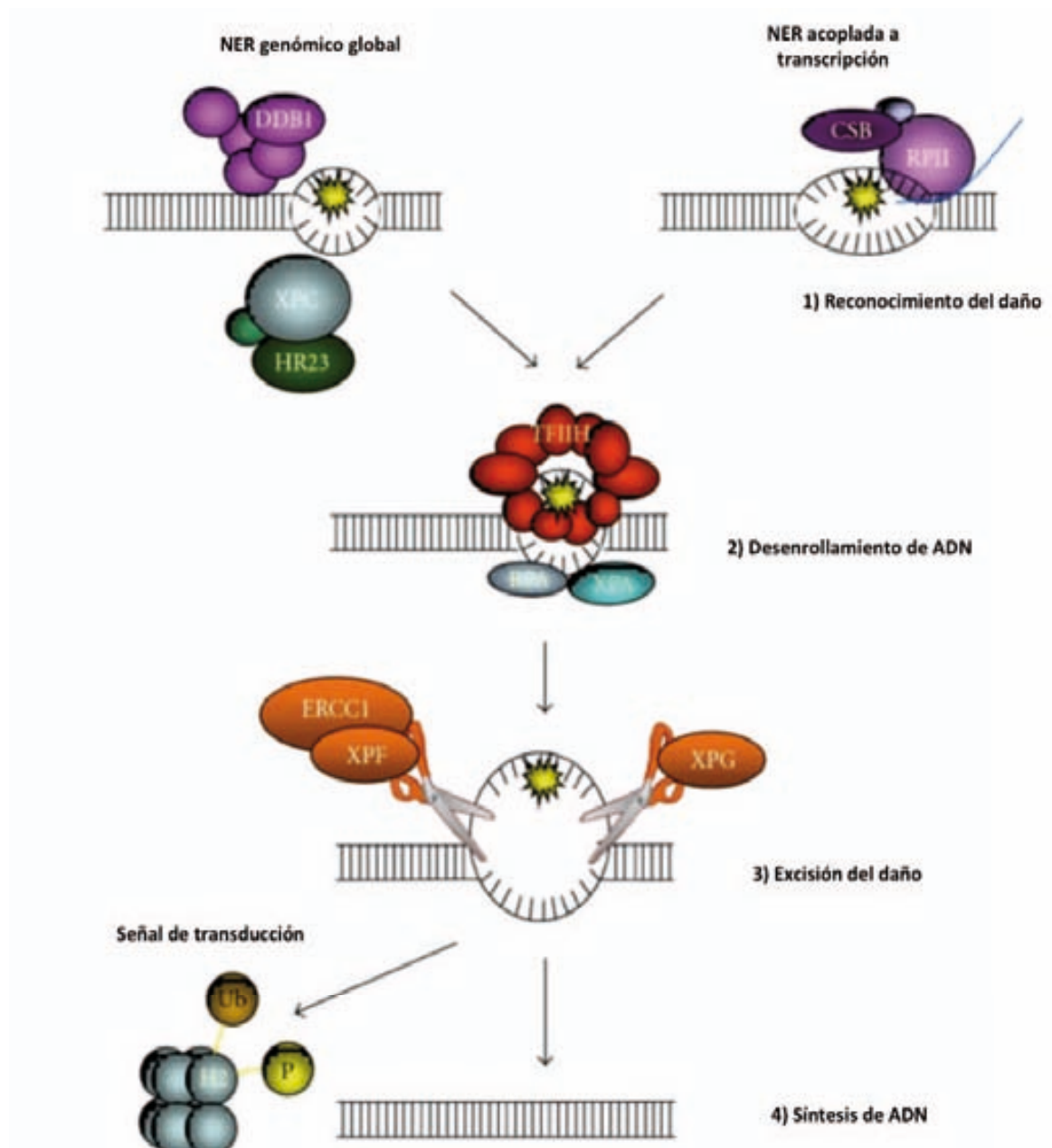


Figura 11. Vía de reparación por escisión de nucleótidos. La reparación en la TC-NER está compuesta por cuatro pasos principales: 1) primero, el daño es reconocido durante la transcripción por la polimerasa II y la proteína cockayne syndrome B(CSB). 2) el complejo TFIIH (formado por XPB y XPD) es reclutado para desenrollar aproximadamente unas 30 pares de bases alrededor de la zona de ADN dañada. 3) las endonucleasas ERCC1/XPF y XPG rompen los extremos 3' y 5' de la cadena dañada generando un oligonucleótido de aproximadamente 24-32 pares de bases que contiene la lesión. 4) finalmente, la síntesis de ADN *de novo* completa la reparación mediante la maquinaria normal de replicación de ADN.

La proteína ERCC1(escisión repair cross-complementing group1) participa activamente en esta vía de reparación. Se han correlacionado unos niveles de expresión bajos de ERCC1 con una disminución de la capacidad reparadora del ADN y por lo tanto una mayor eficacia de los tratamientos basados en platino [219]. En el gen que codifica para esta proteína se han descrito diversos polimorfismos. El más estudiado es el ERCC1 C118T, pero en los estudios realizados en cáncer de recto tratado con quimiorradioterapia no se ha encontrado ninguna asociación con la respuesta a los tratamientos.

La proteína XPD (xeroderma pigmentosum D), también conocida como ERCC2 (escisión repair cross-complementing group 2), también está involucrada en la vía NER. De todos los polimorfismos descritos en ERCC2, el más estudiado es un cambio de A>C que conlleva un cambio de aminoácido de lisina por glutamina (Lys751Gln). En cáncer de recto localmente avanzado este SNP no se ha relacionado con la respuesta.

Recientemente, un metaanálisis que incluyó 17 estudios ha concluido que la presencia de las variantes alélicas de los polimorfismos ERCC1 C118T y ERCC2 Lys751Gln es un factor de mal pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal tratados con oxaliplatino [220].

La vía BER repara el daño producido por las reacciones oxidativas, la metilación, la deaminación o la hidroxilación que tienen lugar en la célula. Además también participa en la reparación del daño producido por el oxaliplatino y las radiaciones ionizantes. La figura 12 esquematiza esta vía y muestra las proteínas implicadas en su funcionamiento.

Introducción

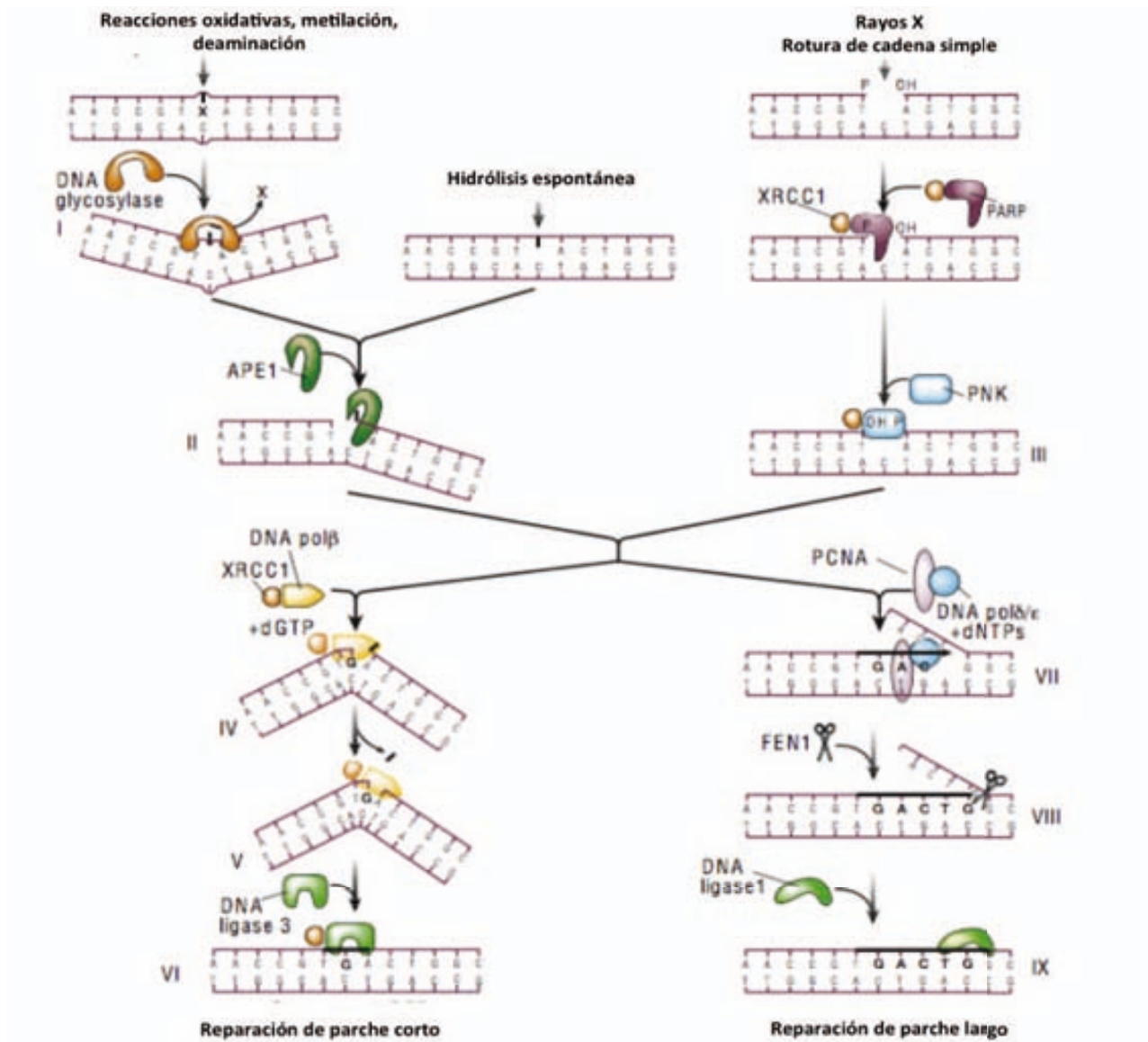


Figura 12. La vía de reparación por escisión de bases. La vía BER se divide en reparación de parche corto y reparación de parche largo. La primera y mayoritaria reemplaza la lesión con un solo nucleótido, mientras que la segunda reemplaza la lesión con entre 2 y 20 nucleótidos. La vía BER de parche corto comprende diferentes pasos: I) varias ADN-glicosilasas se encargan de excindir la lesión, aunque también se puede producir una hidrólisis espontánea. II) La APE1 endonucleasa realiza una escisión en una localización apurínica/apirimidínica. III) La polimerasa poli-ADP-ribosa (PARP) se une al punto de la lesión mientras que una polinucleótido quinasa (PNK) orienta los extremos de la reparación. IV-V) La ADN-polimerasa B rellena el vacío. VI) El complejo XRCC1-ligasa sella la reparación de la lesión. En la vía de parche largo (VII-IX) están implicadas diferentes ADN polimerasas y el antígeno de proliferación celular del núcleo (PCNA) entre otras.

La proteína XRCC1 (X ray repair cross-complementing protein 1) participa de forma activa en esta vía formando un complejo con la ADN polimerasa B. Se han estudiado distintos polimorfismos en el gen que codifica para esta proteína como biomarcadores pronósticos y predictivos en distintos tipos de cáncer. Los tres polimorfismos no-sinónimos más evaluados y que han demostrado alterar la capacidad reparadora de ADN de esta proteína son: Arg194Trp, Arg280His y Arg399Gln. Estos polimorfismos también han sido estudiados como factores de respuesta al tratamiento neoadyuvante con quimiorradioterapia en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado. Algunos de los resultados obtenidos en estos estudios evidencian una asociación entre los genotipos codificantes para arginina con una mejor respuesta y una mejor SLP [216, 217].

2.- OBJETIVOS

En oncología y en concreto en el tratamiento del cáncer colorrectal, la eficacia de los fármacos disponibles es limitada. En la enfermedad metastásica las tasas de respuesta son relativamente bajas y, en el contexto adyuvante, la quimioterapia aporta una escasa reducción de las recaídas de la enfermedad. Por otro lado, la toxicidad asociada tanto al tratamiento con citostáticos como a las nuevas terapias biológicas es importante.

Los estudios farmacogenéticos tienen como finalidad la búsqueda de factores genéticos predictivos de respuesta y/o toxicidad, tanto a los tratamientos convencionales como a las nuevas terapias biológicas.

La vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico es una de las más relevantes dado que un gran número de tumores colorrectales depende de ella para proliferar y diseminarse. En la actualidad, el empleo de terapias biológicas que actúan en esta vía ha contribuido al aumento de la supervivencia en pacientes con CCR metastático. Pese a la existencia de biomarcadores de respuesta a estos fármacos, todavía existe un número importante de pacientes que no pueden beneficiarse de estos tratamientos.

La vía del EGFR también juega un papel en el contexto del cáncer de recto localmente avanzado ya que está implicada en la resistencia al tratamiento con radioterapia. Sin embargo, en este contexto no existe ningún biomarcador que ayude a predecir que pacientes se beneficiarán más del tratamiento con quimiorradioterapia y presentarán una respuesta completa patológica asociada a una mejor supervivencia.

Objetivos

En base a lo expuesto los objetivos de la presente tesis son:

- Análisis de variantes genéticas en genes implicados en la vía del factor de crecimiento epidérmico como marcadores farmacogenéticos de respuesta y/o supervivencia a un tratamiento sistémico basado en fármacos anti-EGFR, en pacientes con cáncer colorrectal metastático.
- Análisis de variantes genéticas en la vía del factor de crecimiento epidérmico y los genes implicados en la reparación del ADN y el metabolismo de las fluorouracilinas como factores predictivos de respuesta al tratamiento con quimiorradioterapia neoadyuvante administrada en el cáncer de recto localmente avanzado.

3.- RESULTADOS

3.1.1.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer colorrectal metastásico

En este apartado se incluyen las dos publicaciones que se describen a continuación:

3.1.1.1.-The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the KRAS 30-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients

Pharmacogenetics and Genomics. 2013;23:142-147

Ana Sebio, Laia Paré, David Pérez, Juliana Salazar, Alan González, Núria Sala, Elisabeth del Río, Marta Martín-Richard, María Tobeña, Agustín Barnadas y Montserrat Baiget

Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu I Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain



Objetivo: la mutación de KRAS es un fuerte predictor negativo de respuesta a terapias contra el factor de crecimiento epitelial (EGFR), sin embargo no todos los pacientes con genotipo nativo responden. La familia de microRNAs “lethal-7” (let-7) regula la actividad de KRAS. Un polimorfismo funcional (rs61764370) ha sido descrito en el sitio complementario de let-7 6 (LCS6). En este trabajo se plantea la hipótesis de una posible asociación entre este KRAS let-7 LCS6 polimorfismo y la respuesta a los tratamientos anti-EGFR en pacientes con KRAS y BRAF nativo afectados de cáncer colorrectal metastásico (mCCR).

Materiales y métodos: hemos estudiado la asociación del polimorfismo KRAS let-7 LCS6 con la respuesta en 100 pacientes con mCCR tratados con anticuerpos anti-EGFR. Para evaluar el efecto real de este polimorfismo en relación al tratamiento administrado, también hemos estudiado esta asociación en una cohorte independiente de pacientes tratados exclusivamente con quimioterapia. El polimorfismo KRAS let-7 LCS6 fue genotipado usando el sistema BioMark™ en muestras de sangre periférica y de tumor. La mutación de BRAF V600E fue analizada en muestras de tumor.

Resultados: el alelo G del KRAS let-7 LCS6 mostró una asociación significativa con la falta de respuesta al tratamiento basado en anti-EGFR: 31.9% de los pacientes con el genotipo T/T presentaron una respuesta completa o parcial frente a ningún paciente con los genotipos T/G o G/G ($P=0.004$). En el grupo de pacientes que recibió quimioterapia exclusivamente no se observó ninguna diferencia significativa.

Conclusión: estos datos avalan el papel del polimorfismo KRAS let-7 LCS6 como predictor de eficacia a tratamiento basado en anti-EGFR en pacientes con mCCR con KRAS y BRAF nativo.



The LCS6 polymorphism in the binding site of *let-7* microRNA to the *KRAS* 3'-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients

Ana Sebio^a, Laia Paré^b, David Páez^a, Juliana Salazar^{b,d}, Alan González^c, Núria Sala^a, Elisabeth del Río^b, Marta Martín-Richard^a, María Tobeña^a, Agustí Barnadas^a and Montserrat Baiget^{b,d}

Objective Although *KRAS* mutation status has been identified as a strong predictor of response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapies, not all wild-type patients respond. The lethal-7 (*let-7*) family of microRNAs regulates *KRAS* activity. A functional polymorphism (rs61764370) has been described in the *let-7* complementary site (LCS6). We hypothesized a possible association between this *KRAS let-7* LCS6 polymorphism and the response to anti-EGFR treatments in *KRAS* and *BRAF* wild-type metastatic colorectal cancer patients (mCRC).

Materials and methods We studied the association of the *KRAS let-7* LCS6 polymorphism with the response in 100 refractory mCRC patients treated with anti-EGFR antibodies. To assess the real effect of this polymorphism in relation to the treatment administered, we also studied this association in an independent cohort of patients treated exclusively with chemotherapy. The *KRAS let-7* LCS6 polymorphism was genotyped using the BioMark system in blood and tumor DNA samples. The *BRAF* V600E mutation was analyzed in tumor samples.

Results The *KRAS let-7* LCS6 G-allele showed a statistically significant association with nonresponse to anti-EGFR-based treatment: 31.9% of patients with the

T/T genotype presented a complete or a partial response versus no patients with T/G or G/G genotypes ($P=0.004$). No statistically significant differences were observed in the patients who received chemotherapy only.

Conclusion These data support the pharmacogenetic role of the *KRAS let-7* LCS6 polymorphism in predicting the efficacy of anti-EGFR-based therapy in mCRC patients with the *KRAS* and the *BRAF* wild-type genotype. *Pharmacogenetics and Genomics* 00:000-000 © 2013 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2012, 00:000-000

Keywords: anti-epidermal growth factor receptor, colorectal cancer, *KRAS*, *Let-7* microRNA, polymorphism

Departments of ^aMedical Oncology, ^bGenetics, ^cPathology, Hospital of the Holy Cross and Saint Paul, University Autònoma de Barcelona and ^dU-705 CIBERER, Barcelona, Spain

Correspondence to David Páez, Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

Tel: +34 93 5535638; fax: +34 93 5535769; e-mail: dpaez@santpau.cat

Ana Sebio and Laia Paré contributed equally to the writing of this article.

Received 7 August 2012 Accepted 5 December 2012

Introduction

The survival of patients with colorectal cancer has improved considerably over the last decade because of new combinations of chemotherapy and the recently introduced targeted therapies [1–4]. Two of the most widely used targeted therapies are epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies, cetuximab and panitumumab. The most relevant biological marker of anti-EGFR treatment benefit is *KRAS* mutation status [4,5]. However, many patients (40–50%) with a wild-type *KRAS* status do not respond to anti-EGFR monoclonal antibodies. Therefore, novel markers of benefit to anti-EGFR agents are warranted [6]. Recently, in a retrospective consortium analysis, the effects of mutations in four downstream components of the EGFR signaling pathway (*KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA*)

were analyzed in a large cohort of patients. The study confirmed the negative effect of *KRAS* mutations on outcome after anti-EGFR therapy and showed that *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations are significantly associated with a low response rate [7].

Of particular interest in colorectal cancer is the study of the lethal-7 (*let-7*) family of microRNAs (miRNAs), which consists of 12 genes encoding for nine distinct miRNA (*let-7a* to *let-7i*). miRNAs are highly conserved, small noncoding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level through binding to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the target mRNAs. miRNA polymorphisms (miR-SNPs) are a novel class of functional polymorphisms that have been postulated to influence drug response by affecting the expression of

drug target genes. The *KRAS* 3'-UTR contains *let-7* complementary sites (LCSs) that allow *let-7* to bind regulating *KRAS* expression [8,9].

In experimental models, colon cancer cells transfected with the *let-7a-1* precursor showed significant growth suppression and a decrease in the *KRAS* and c-myc protein levels, whereas the mRNA levels remained unchanged [10]. A functional single nucleotide polymorphism (SNP) has been described in the *KRAS* 3'-UTR (rs61764370) in the *let-7* complementary site (LCS6). This polymorphism consists of a T>G base change that alters the binding ability of the mature *let-7* to the *KRAS* mRNA. In-vitro experiments in lung cancer tumors samples have shown that the G variant allele increases *KRAS* expression [11]. Smits *et al.* [12] studied this variant allele as a potential prognostic marker in colorectal cancer and found that in early stages, the G variant allele is associated with a better outcome, especially in patients with the *KRAS* mutation. This association was not found in patients with colorectal cancer stage III or IV [12]. However, the G-allele has also been associated with reduced survival in oral cancer patients [13] and with a poor outcome in postmenopausal women with epithelial ovarian cancer [14].

Recently, two groups of researchers [15,16] evaluated the involvement of the *KRAS let-7LCS6* SNP in the response to targeted therapies, reporting conflicting results. It was suggested that the backbone chemotherapy could account for the differences found [17].

The aim of this study is to clarify the role of *KRAS let-7LCS6* SNP in the efficacy of anti-EGFR therapy. We investigated this polymorphism in DNA from peripheral blood and also in DNA from tumor tissue in a cohort of wild-type *KRAS* patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with anti-EGFR antibodies. We evaluated the associations between the *KRAS let-7LCS6* genotype and response, overall survival (OS), and progression-free survival (PFS) after excluding patients harboring the *BRAF* V600E mutation. To test the implications of the chemotherapy backbone, we also studied an independent cohort of patients treated with chemotherapy alone.

Materials and methods

Eligible patients

We analyzed 100 White patients with *KRAS* wild-type refractory metastatic colorectal adenocarcinoma. They were treated with cetuximab (Erbix; Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA) or panitumumab (Vectibix; Amgen, Thousand Oaks, California, USA) in monotherapy or in combination with chemotherapy. In an independent cohort, we analyzed 75 White patients treated with FOLFIRI (irinotecan, 5-fluorouracil) as first-line chemotherapy for mCRC.

Clinical data (sex, age, ECOG performance status score, etc.) were obtained from clinical records. Patients were classified according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) risk model into three prognostic groups depending on four baseline clinical parameters: performance status, white blood cell count, alkaline phosphatase, and number of metastatic sites in low, medium, and high risk [18]. Skin toxicity was graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (version 2.0; National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA). Response to treatment was evaluated every 2–3 months by tomodesitometry according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors 1.1 [19] and classified as follows: (i) complete response (CR), (ii) partial response (PR), (iii) stable disease, or (iv) progressive disease. For the statistical analyses, the best tumor response was selected. The median duration of follow-up was 11 months (range, 1–43 months) for the anti-EGFR-based treatment group and 19 months (range, 3–93 months) for the chemotherapy-alone group. All patients signed informed consent for tissue and blood collection and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Genetic analyses

The genomic DNA was extracted from blood samples using the salting-out procedure [20]. Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor blocks were reviewed for quality and tumor content, and a single representative tumor block from each patient, containing at least 70% of neoplastic cells, was selected. DNA was extracted from tumor tissue samples using the QiAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). *KRAS* mutations in codons 12 and 13 were assessed on tumor DNA. Mutational analysis was carried out by PCR amplification of exon 2 of the *KRAS* gene following the instructions of the Therascreen *KRAS* PCR kit (Qiagen GmbH). We genotyped the blood and tumor samples for the rs61764370 polymorphism (located in the LCS6, where the *Let-7* miRNA binds to the *KRAS* 3'-UTR [11]) and the *BRAF* V600E mutation in tumor samples using the 48.48 dynamic array chips on the BioMark system (Fluidigm, San Francisco, California, USA). The samples and the TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) mixes were prepared following the manufacturer's recommendations. Briefly, the chips were primed in the NanoFlex IFC Controller (Fluidigm) before loading the mixes into the inlets. Next, the samples and genotyping assay mixes were loaded into the inlets of the dynamic array chips and placed again in the IFC Controller for loading and mixing for 45 min. PCR was performed using the BioMark system. The thermal cycling conditions were an initial step at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s (denaturation) and 60°C for 1 min (annealing and extension). Finally, the endpoint fluorescent image data were acquired on the

BioMark Real-Time PCR System (Fluidigm) and data were analyzed using the Fluidigm SNP Genotyping Analysis software (Fluidigm). Normal, heterozygous, and homozygous sequenced samples were included in every chip as internal controls.

Statistical analysis

The distribution of genotypes was tested for Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The differences between categorical variables were calculated using the χ^2 -test. Logistic regression was used as a multivariate method to ascertain which variables independently predicted response after adjustment for other relevant clinical variables. Kaplan-Meier estimates and log-rank tests were used in the univariate analysis of PFS and OS. PFS was calculated from the onset of systemic treatment until progression of the neoplasia or death. OS was calculated from the start of systemic treatment to death, irrespective of the cause. The Cox regression method was used for the multivariate analyses of PFS and OS. Results were considered statistically significant when P values were less than 0.05.

Results

We studied a total of 100 refractory mCRC patients treated with anti-EGFR antibodies in monotherapy or in combination with chemotherapy. The baseline characteristics are detailed in Table 1. Eighty-nine patients (89%) were treated with chemotherapy plus cetuximab and 11 patients (11%) were treated with panitumumab in monotherapy. Most patients (57%) were treated in a second-line setting, whereas 33 and 10% of the patients were treated in a third-line and fourth-line setting, respectively. (Table 1). Four patients were not evaluated for response as clinical data were not available. *BRAF* V600E mutation screening was performed in 79 tumor samples; four patients harboring this mutation were excluded from the analysis. Two patients (2.2%) had CR, 21 had PR (22.8%), 44 had stable disease (47.8%), and 25 progressed (27.2%). No statistically significant differences in response were observed between the patients receiving chemotherapy plus anti-EGFR treatment or anti-EGFR alone (Table 1). The median PFS was 6 months (range, 0.5–30) and the median OS was 12 months (range, 1–43).

Clinical parameters and outcome

We found a significant relationship between performance status and clinical response: 30% of patients with 0 or 1 performance status showed CR/PR, whereas only 9% of patients with performance status greater than 1 showed CR/PR ($P = 0.048$). There were also significant differences in the clinical response when patients were grouped according to the EORTC clinical risk classification. Eight patients (26%) in the low-risk group achieved a CR/PR, whereas no patients in the high-risk group

Table 1 Baseline characteristics of metastatic colorectal cancer patients treated with anti-epidermal growth factor receptor therapy ($N = 100$)

	N	Response rate (RR)* [N (%)]		P value
		CR/PR	SD/PD	
Mean age (range, years)	66 (34–85)	–	–	–
Sex				0.530
Female	36	7 (21.2)	26 (78.8)	
Male	64	16 (27.1)	43 (72.9)	
ECOG performance status				0.048
0–1	74	21 (30)	49 (70)	
2	26	2 (9.1)	20 (90.9)	
Previous lines of chemotherapy				0.229
1	57	12 (22.2)	42 (77.8)	
2	33	9 (32.1)	19 (67.9)	
≥ 3	10	2 (20)	8 (80)	
Clinical classification				0.013
Low risk	33	8 (25.8)	23 (74.2)	
Intermediate risk	46	15 (35.7)	27 (64.3)	
High risk	21	0 (0)	19 (100)	
Anti-EGFR treatment				0.632
Alone	11	2 (22.2)	7 (77.8)	
Plus irinotecan	60	17 (22.4)	59 (77.6)	
Plus oxaliplatin	9	4 (57.1)	3 (42.9)	
Skin toxicity grade				0.024
0–1	37	4 (12.1)	29 (87.9)	
≥ 2	63	19 (32.2)	40 (67.8)	
Metastatic sites involved				0.258
1	45	9 (22)	32 (78)	
> 1	55	14 (27.5)	37 (72.5)	
KRAS <i>let-7</i> LCS6 genotype				0.004
T/T	78	23 (31.9)	49 (68.1)	
T/G and G/G	22	0 (0)	20 (100)	

CR, complete response; EGFR, epidermal growth factor receptor; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease.

*RR: this parameter has been calculated for 92 patients available for response, χ^2 -test.

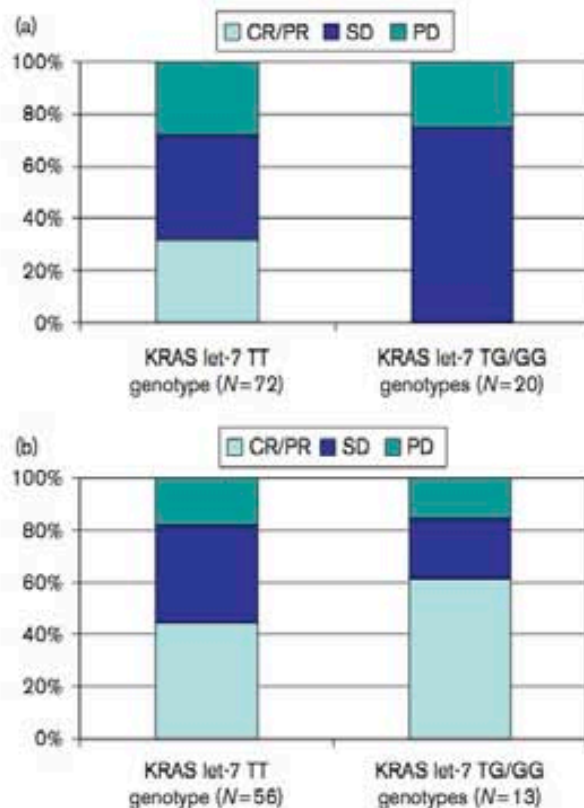
showed a response ($P = 0.013$). The median PFS was longer for the low-risk patients [9 months; 95% confidence interval (CI): 7.5–10.7] than for the intermediate-risk and high-risk patients (7 months; 95% CI: 4.6–9.3 and 2 months; 95% CI: 0.3–3.7, respectively) ($P < 0.0001$). OS also differed according to the clinical risk classification: 25 months (95% CI: 16.5–33.46) in low-risk patients, 12 months (95% CI: 6.6–17.3) in intermediate-risk patients, and 5 months (95% CI: 3.5–6.4) in high-risk patients ($P < 0.01$).

The severity of skin rash was significantly associated with a clinical response: 19 patients (32%) with severe skin toxicity responded to treatment versus only four patients (12%) with grade 0/1 skin toxicity ($P = 0.024$). Skin rash toxicity was also associated with a better PFS: 4 months (95% CI: 2.4–5.5) for patients presenting skin rash grade 0/1 versus 8 months (95% CI: 6.5–9.4) for skin rash grade 2 or 3 ($P = 0.001$).

Genetic determinants and outcome

Among the 96 patients with a *BRAF* wild-type genotype, 74 (77%) had a KRAS-LCS6 wild-type genotype (T/T), whereas 22 patients (23%) were carriers of the variant allele (T/G or G/G).

Fig. 1



Tumor response by the *KRAS* let-7 LCS6 polymorphism. (a) Tumor response by the *KRAS* let-7 LCS6 genotype in patients treated with anti-epidermal growth factor receptor therapy ($N=92$). $P=0.004$. (b) Tumor response by the *KRAS* let-7 LCS6 genotype in patients treated with chemotherapy alone ($N=69$). $P=0.29$. CR, complete response; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease.

Comparison between the *KRAS*-LCS6 genotype in blood and tumor samples yielded identical results in 98% of cases. Although a heterozygous T/G genotype was observed in DNA from peripheral blood, a homozygous T pattern was observed in the tumor samples of two patients. This finding has never been reported before for the *KRAS* let-7 variant and these exceptions could correspond to the loss of heterozygosity in the tumor sample.

The *KRAS* let-7 LCS6 polymorphism was associated with response: none of the patients with the variant allele (T/G or G/G) achieved a radiological response, whereas 31.9% of patients in the wild-type group (T/T) responded ($P=0.004$) (Fig. 1a). In the multivariate analysis, the logistic regression method confirmed that skin toxicity and EORTC clinical classification and *KRAS* let-7 LCS6 polymorphism remained statistically significant irrespective of other clinical parameters. The pharmacogenetic marker showed an odds ratio of 0.15 (CI 95%: 0.01–0.83; $P=0.034$).

No statistically significant differences were observed in PFS ($P=0.76$) or OS ($P=0.24$) on the basis of carriers

Table 2 Baseline characteristics of metastatic colorectal cancer patients treated with FOLFIRI in a first-line setting ($N=75$)

	N (%)
Mean age (range, years)	68 (24–83)
Sex	
Female	48 (64)
Male	27 (36)
ECOG performance status score	
0–1	62 (82.6)
2	13 (17.3)
<i>KRAS</i> -LCS6 polymorphism	
T/T	59 (78.6)
T/G	15 (20)
G/G	1 (1.4)
Anatomic site	
Right colon	13 (17.4)
Left colon	11 (14.8)
Sigmoid	27 (36)
Rectosigmoid	6 (8)
Rectum	18 (24)
Metastasis development	
Synchronous	35 (46.6)
Metachronous	40 (53.4)

harboring the *KRAS* let-7 LCS6 variant allele. However, in a homogenous subgroup of patients who received the irinotecan–cetuximab regime ($n=42$) in a second-line setting, the *KRAS* let-7 LCS6 variant allele had a trend toward a worse PFS. The median PFS was 9 months (95% CI: 5.5–12.4) in patients with a T/T genotype compared with 7 months (95% CI: 2.4–11.6) in patients harboring the variant allele (T/G or G/G genotypes; $P=0.075$).

To test the hypothesis that the *KRAS* let-7 LCS6 genotype influences response only in patients treated with anti-EGFR therapy (alone or in combination with chemotherapy), we selected a second group of patients. We studied 75 patients receiving a FOLFIRI regime as first-line chemotherapy and correlated their *KRAS* let-7 LCS6 genotype with response, PFS, and OS. Table 2 shows the clinical characteristics of this cohort. Four patients (5.8%) achieved a CR, 29 achieved a PR (42%), 24 achieved an EE (34.7%), 12 progressed (17.4%), and six patients were not evaluated for response. The median PFS was 9 months (range, 0.5–21) and the median OS was 19 months (range, 3–93).

Figure 1b shows the lack of association between the *KRAS* let-7 LCS6 genotype and response: CR/PR was achieved in 44.6% of patients harboring the T/T genotype and in 61.5% of patients whose genotype contained the G-allele ($P=0.29$). Neither PFS nor OS was influenced by the *KRAS* let-7 LCS6 polymorphism: PFS was 9 and 10 months for T/T and T/G-G/G genotypes, respectively ($P=0.3$); OS was 24 months for patients harboring the T/T genotype and 20 months for the patients whose genotype contained the G-allele ($P=0.39$).

Discussion

In the present work, we analyzed the clinical response according to the *KRAS* let-7 LCS6 polymorphism

in mCRC patients without *KRAS* and *BRAF* mutations. Our results showed that no patient with the variant allele (T/G or G/G) achieved a clinical response, whereas 31.9% of patients in the wild-type group (T/T) responded ($P=0.004$). Another interesting finding is that in a homogeneous subgroup of 42 patients, all treated with irinotecan–cetuximab as second-line treatment, we observed a trend toward higher PFS in patients with the T/T genotype. In addition, in an independent cohort of patients treated with first-line chemotherapy FOLFIRI, we did not find any relationship between the LCS6 SNP genotype and the response rate, PFS, or OS.

The potential role as a pharmacogenetic marker of this functional SNP (rs61764370) in the *KRAS* gene (LCS6) had been analyzed in previous studies that yielded contradictory results. Graziano *et al.* [15] studied the association between the rs61764370 polymorphism and survival outcomes in 134 patients with mCRC treated with salvage cetuximab/irinotecan. A comprehensive study of codons 12, 13, and 61 in *KRAS* and of the *BRAF* V600E mutation was carried out. They found that the 63 patients with *KRAS* wild-type and *BRAF* wild-type and with the *KRAS* let-7 LCS6 G-allele showed worse OS ($P=0.001$) and PFS ($P=0.004$) than patients with a T/T genotype. Disease control was also lower in the T/G and G/G genotype groups of patients ($P=0.02$). Zhang *et al.* [16] studied the association between the *KRAS* let-7 LCS6 polymorphism and response in 130 mCRC patients treated with cetuximab in monotherapy. They reported that this SNP predicted response in the 67 cases without mutations in codons 12 and 13 of the *KRAS*: patients with a T/T genotype ($n=55$) had a worse objective response rate than patients ($n=12$) with the T/G or the G/G genotype, 9 versus 42% objective response rate, respectively ($P=0.02$). It was also found that patients with the G-allele had a trend toward longer PFS (3.9 vs. 1.3 months) and OS (10.7 vs. 6.4 months) than those with a T/T genotype.

To clarify these controversial results, both groups later published additional comments and new data. In a letter to the editor, Ruzzo *et al.* [21] emphasized two points: (i) that it would be of interest to know the percentage of mutated *KRAS* codon 61 and the *BRAF* status in the patients with the *KRAS* let-7 LCS6 T/T genotype analyzed by Zhang *et al.* [17] and (ii) that in a previous abstract presentation that included patients treated with irinotecan/cetuximab, Zhang and colleagues reported results similar to those of the Italian group. In the letter of response, Zhang *et al.* [17] stated that the mutation status of *KRAS* and *BRAF* did not alter their previous results and suggested that the chemotherapy backbone may play an important role when analyzing the *KRAS* let-7 LCS6 SNP as a predictive marker.

Recently, Ruzzo *et al.* [22] analyzed the relationship between Let-7a miRNA levels and the clinical outcome

in 65 patients with the *KRAS* mutation treated with salvage irinotecan/cetuximab. In this work, the *KRAS* let-7 LCS6 polymorphism was also studied. The results showed that high levels of let-7 miRNA were significantly associated with better survival outcomes ($P=0.01$). The same findings with an accentuated positive effect were observed in an exploratory analysis of the 45 patients with a T/T genotype ($P=0.002$). This study supports the previous finding that the *KRAS* let-7 LCS6 variant predicts low levels of let-7 [11,14].

Our results parallel those published by the Italian group [13,19] showing that patients who harbor a T/T genotype have a higher probability of response to irinotecan anti-EGFR therapy. In an attempt to clarify how the backbone chemotherapy might influence our results, we studied an independent cohort of patients treated exclusively with chemotherapy. In this group, no differences in response or survival were found according to the *KRAS* let-7 LCS6 genotype. We therefore conclude that although the variant allele does not influence response in patients treated with chemotherapy alone, the LCS6 SNP predicts poor response in refractory mCRC patients without *KRAS* and *BRAF* mutations treated with anti-EGFR therapy. However, because of the fact that few patients were treated with anti-EGFR monotherapy, we are underpowered to fully assert that the *KRAS* let-7 LCS6 genotype influences response in patients treated with anti-EGFR monotherapy. The real value of this polymorphism should be confirmed and validated in prospective clinical trials.

Acknowledgements

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (FIS/1101711, CM11/00102 to Ana Sebio and CM08/00065 to David Pácz).

The authors thank Carolyn Newey for English language editing and Ignasi Gich for statistical analysis.

Conflicts of Interest

There are no conflicts of interest.

References

- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**:337–345.
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJS, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; **22**:1201–1208.
- Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, *et al.* Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; **25**:1658–1664.
- Van Cutsem E, Kohne CH, Hitt E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhsos A, *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; **360**:1408–1417.
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, *et al.* Wild-type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; **26**:1626–1634.

- 6 Wilson PM, Labonte MJ, Lenz HJ. Molecular markers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 2010; **16**:262–272.
- 7 De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; **11**:753–762.
- 8 Mahra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009; **10**:399–416.
- 9 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; **120**:635–647.
- 10 Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2006; **29**:903–906.
- 11 Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 2008; **68**:8535–8540.
- 12 Smits KM, Paranjape T, Nallur S, Wouters KA, Weijnenberg MP, Schouten L, et al. A let-7 microRNA SNP in the KRAS 3'UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011; **17**:7723–7731.
- 13 Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* 2009; **30**:1003–1007.
- 14 Ratner ES, Keane FK, Lindner R, Tassi RA, Paranjape T, Glasgow M, et al. A KRAS variant is a biomarker of poor outcome, platinum chemotherapy resistance and a potential target for therapy in ovarian cancer. *Oncogene* 2012; **31**:4559–4566.
- 15 Graziano F, Canestrari E, Loupakis F, Ruzzo A, Galluccio N, Santini D, et al. Genetic modulation of the let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics J* 2010; **10**: 458–464.
- 16 Zhang W, Winder T, Ning Y, Pohl A, Yang D, Kahn M, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Ann Oncol* 2011; **22**:104–109.
- 17 Zhang W, Labonte MJ, Lenz HJ. KRAS let-7 LCS6 SNP predicts cetuximab efficacy in KRASwt metastatic colorectal cancer patients: does treatment combination partner matter? *Ann Oncol* 2011; **22**:484–485.
- 18 Kohne CH, Cunningham D, Di CF, Glimelius B, Blijham G, Aranda E, et al. Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol* 2002; **13**:308–317.
- 19 Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; **45**:228–247.
- 20 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**:1215.
- 21 Ruzzo A, Canestrari E, Galluccio N, Santini D, Vicenzi B, Tonini G, et al. Role of KRAS let-7 LCS6 SNP in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2011; **22**:234–235.
- 22 Ruzzo A, Graziano F, Vicenzi B, Canestrari E, Perrone G, Galluccio N. High let-7a microRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas may rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease. *Oncologist* 2012; **17**:823–829.

3.1.1.2.- Intergenic polymorphisms in the amphiregulin gene region as biomarkers in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR plus irinotecan

The Pharmacogenomics Journal. 2014;14:256-262

Ana Sebio, David Páez, Juliana Salazar, Antoni Berenguer-Llargo, Laia Paré-Brunet, Adriana Lasa, Elisabeth del Río, Maria Tobeña, Marta Martín-Richard, Montserrat Baiget, Agustí Barnadas.

Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain



Resumen

En la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), polimorfismos en el EGFR y su ligando EGF han sido estudiados como biomarcadores para el tratamiento con anti-EGFR. Sin embargo, el potencial papel de otros ligandos del EGFR como la anfiregulina (AREG) y la epiregulina (EREG) no ha sido elucidado. Nosotros hemos estudiado 74 pacientes con CCRm con KRAS y BRAF nativo tratados con anti-EGFR e irinotecan. Veintidós variantes genéticas en EGFR, EGF, AREG y EREG fueron seleccionadas usando la base de datos HapMap y recursos bibliográficos. Tres tag-polimorfismos intergénicos de nucleótido simple en la región génica de AREG (rs11942466 C>A, rs13104811 A>G, and rs9996584 C<T) predijeron control de enfermedad en el análisis multivariado. AREG rs11942466 C>A y rs9996584 C>T también se asociaron con la supervivencia global (SG). El polimorfismo funcional EGFR rs712829 G>T se asoció con la supervivencia libre de progresión y la SG. Nuestros hallazgos respaldan que polimorfismos intergénicos en la región genética de AREG pueden ayudara identificar pacientes con cáncer colorrectal que se beneficiarán del tratamiento con irinotecan y anti-EGFR.

ORIGINAL ARTICLE

Intergenic polymorphisms in the amphiregulin gene region as biomarkers in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR plus irinotecan

A Sebio¹, D Páez¹, J Salazar^{2,3}, A Berenguer-Llargo⁴, L Paré-Brunet², A Lasa², E del Río², M Tobeña¹, M Martín-Richard¹, M Baiget^{2,3} and A Barnadas¹

In the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway, polymorphisms in EGFR and its ligand EGF have been studied as biomarkers for anti-EGFR treatment. However, the potential pharmacogenetic role of other EGFR ligands such as amphiregulin (AREG) and epiregulin (EREG) has not been elucidated. We studied 74 *KRAS* and *BRAF* wild-type metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR plus irinotecan. Twenty-two genetic variants in *EGFR*, *EGF*, *AREG* and *EREG* genes were selected using HapMap database and literature resources. Three tagging single-nucleotide polymorphisms in the AREG gene region (rs11942466 C>A, rs13104811 A>G, and rs9996584 C>T) predicted disease control in the multivariate analyses. AREG rs11942466 C>A and rs9996584 C>T were also associated with overall survival (OS). The functional polymorphism, EGFR rs712829 G>T, was associated with progression-free and OS. Our findings support that intergenic polymorphisms in the AREG gene region might help to identify colorectal cancer patients that will benefit from irinotecan plus anti-EGFR therapy.

The *Pharmacogenomics Journal* advance online publication, 20 August 2013; doi:10.1038/tpj.2013.29

Keywords: amphiregulin; anti-EGFR; colorectal cancer; EGFR pathway; intergenic; polymorphisms

INTRODUCTION

Survival of metastatic colorectal cancer (mCRC) patients has improved over the last decade because of the new combinations of chemotherapy with targeted therapies such as cetuximab (Erbix) and panitumumab (Vectibix).^{1–4} These monoclonal antibodies bind to the epidermal growth factor receptor (EGFR) competing with its natural ligands.⁵ The EGFR is the cell-surface tyrosine kinase receptor for members of the epidermal growth factor family. EGFR activation via ligand binding results in signalling through the several pathways such as PI3K/AKT and Ras/Raf/Mek/Erk, which contributes to cell proliferation, survival, angiogenesis and metastasis development.⁶

KRAS-mutation status remains the most relevant biological marker of response to anti-EGFR treatments.⁷ A mutated *KRAS* gene is a strong predictor of resistance to the anti-EGFR therapies, but only about half of the *KRAS* wild-type patients will benefit from these treatments. Mutations in other downstream components of the EGFR signalling pathway (*BRAF*, *NRAS* and *PIK3CA*) have been analysed in a large cohort of patients.⁸ This study confirmed the negative effect of *KRAS* mutations on outcome after anti-EGFR therapy and showed that *BRAF*, *NRAS* and *PIK3CA* mutations could account for an additional small percentage of non-responding patients. To further increase knowledge on the molecular basis for sensitivity or resistance to anti-EGFR therapy, several studies have been performed. Some of these studies have focused on the *EGFR* gene and in its main ligand, EGF. Two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *EGFR* gene promoter (–216G>T rs712829 and –191C>A

rs712830) have shown to influence mRNA expression.⁹ Another non-synonym polymorphism in the *EGFR* gene, R521K G>A (previously known as R497K, rs2227983) has been proposed to influence ligand binding to EGFR,¹⁰ and, recently, a pharmacogenetic role has been suggested for this SNP in mCRC patients treated with cetuximab-based therapy.¹¹ Also, a polymorphic (CA)_n repeat in *EGFR* intron 1 has been related to the *EGFR* gene transcriptional activity.¹² In the *EGF* gene, the most studied polymorphism, EGF 61 G>A (rs4444903), is located in its 5'-untranslated region and affects the EGF levels *in vitro* and *in vivo*.¹³ This SNP has been associated with the outcome in mCRC patients treated with cetuximab-based therapy.^{14,15}

Although EGF is the natural ligand of EGFR, other members of the EGF family, such as amphiregulin (AREG) and epiregulin (EREG), can bind to this receptor.¹⁶ The study of these ligands as biological markers has evolved around expression studies measured by immunohistochemical staining and mRNA levels.^{17–19} To our knowledge, the potential role of the *AREG* and *EREG* genes as pharmacogenetic markers has not yet been elucidated.

In the present work, we analysed the tagging SNPs (Tag SNPs) in the *AREG* and *EREG* genes in a population of refractory mCRC patients with *KRAS* and *BRAF* wild type, treated with irinotecan-based chemotherapy plus EGFR inhibitors. In these patients, we also analysed the Tag SNPs of the *EGF* gene along with known functional SNPs in the *EGFR* and *EGF* genes. This approach was designed to focus on the different extracellular components of the EGFR pathway as potential pharmacogenetic markers for anti-EGFR treatment.

¹Department of Medical Oncology, Santa Creu i Sant Pau Hospital, Autònoma University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Genetics, Santa Creu i Sant Pau Hospital, Autònoma University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³U-705 CIBERER, Barcelona, Spain and ⁴IDIBELL, Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr D Páez, Department of Medical Oncology, Santa Creu i Sant Pau Hospital, Autònoma University of Barcelona, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: dpaez@santpau.cat

Received 18 March 2013; revised 20 June 2013; accepted 22 July 2013

MATERIALS AND METHODS**Patient population and treatment protocol**

Seventy-four patients with refractory mCRC were included in this retrospective pharmacogenetic study. Tumour samples of all patients were *KRAS* and *BRAF* wild-type genotype. All patients were treated uniformly with anti-EGFR agents plus an irinotecan-based chemotherapy at our institution. Patient clinical data (gender, age, ECOG performance status score and so on) were collected from clinical records. The risk model of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)²⁰ was used to classify patients in three prognostic groups (low, medium and high risk) based on four baseline clinical parameters: performance status, white blood cells count, alkaline phosphatase and number of metastatic sites. Skin toxicity was graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (version 2.0). Response to treatment was evaluated every 2–4 months using the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST 1.1)²¹ and classified as follows: complete response, partial response, stable disease or progressive disease. For the statistical analyses, the disease control rate (complete response, partial response, stable disease vs progressive disease) was selected. This study was approved by the Institutional Ethics Committee at Santa Creu i Sant Pau Hospital, and all patients signed informed consent for tissue and blood collection and analysis.

Genetic studies

We studied a total of 22 SNPs in four genes (*EGFR*, *EGF*, *AREG* and *EREG*) involved in the EGFR pathway. In the *EGFR* and *EGF* genes, four potentially functional polymorphisms were selected from the literature. Table 1 shows the characteristics of the studied germline genetic variants. Tag SNPs were selected for the *EGF*, the *EREG* and the *AREG* genes using the HapMap genome browser based on the CEU population (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgiiperl/gbrowse/hapmap27_B36/) and Haploview software 4.2 following two predefined criteria: (i) coefficient cut off of 0.80 and (ii) minor allele frequency of 0.10. The nine Tag SNPs in the *AREG* gene cover a region of 180 Kb and are all located in the *AREG*–*AREGB* intergenic region (Figure 1).

The genomic DNA was automatically extracted from blood samples using the salting out procedure (Autopure; Qiagen, Hilden, Germany) and was quantified using the BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). We analysed 20 polymorphisms using the 48.48 dynamic array chips on the BioMark system (Fluidigm, San Francisco, CA, USA). The samples and the TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems,

Foster City, CA, USA) mixes were prepared following the manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed using the BioMark system. Data were analysed using the Fluidigm SNP Genotyping Analysis software. The two SNPs, rs712829 and rs712830, were analysed by direct automated DNA sequencing on an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences of the primers used were as follows: forward primer: 5'-ATTCTCTCTCTCTGCTC-3' and reverse primer: 5'-TCTCCGATCAATACTGGAC-3'. Automated Sanger DNA sequencing was also used for quality-control purposes to confirm the results of 15 randomly selected DNA samples. One polymorphism, rs11942466, was sequenced in all patients due to deviations from Hardy–Weinberg equilibrium showing a 99% concordance. SNP allele frequencies were comparable to those previously reported from HapMap.

Statistical analysis

Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were analysed using an exact test. Progression-free survival (PFS) was calculated from the first treatment date until disease progression or death by any cause or last follow-up. Overall survival (OS) was calculated from the first treatment date to the date of death by any cause or last follow-up. For OS and PFS analysis, survival curves and survival medians were estimated at 95% confidence using the Kaplan–Meier estimator. The association between survival and clinical variables was tested using the log-rank test. We evaluated the association between disease control rate and clinical variables using an exact Fisher's test. In all cases, three models of inheritance were considered: additive, dominant and recessive. The inheritance model was selected according to the Akaike Information Criteria.²² Significance of these associations was assessed using the log-likelihood ratio test. The odds ratio (OR) was used to measure the SNP effects in the logistic regression analysis, whereas hazard ratios and survival medians were used in the survival analysis. The association of SNPs and outcomes was evaluated both in a univariate and a multivariate model in which clinical baseline parameters were included as covariates (age, sex, the European Organisation for Research and Treatment of Cancer clinical risk classification, number of previous lines of treatment and number of metastatic locations). A logistic regression model was used to assess the association of each SNP with response, whereas a Cox model was used for PFS and survival analysis. A 95% level of significance was used for all the statistical tests.

For multiple testing adjustments taking into account the number of SNPs and the selection of inheritance model for each SNP, a permutation approach and the Benjamini and Hochberg step-up false discovery

Table 1. Primary information on the analysed polymorphisms

Gene	SNP	Substitution	Location	Function	MAF
<i>EGFR</i>	rs712829	G>T	5' UTR (-216)	30 % increased promoter activity ^a	0.31
	rs712830	C>A	5' UTR (-191)	Reduction of mRNA expression ^a	0.15
	rs2227983	G>A (R497K/R521K)	Exon 13	Reduction in ligand binding, growth stimulation, tyrosine kinase activation and proto-oncogene induction ^b	0.31
<i>EGF</i>	rs6533485	C>G	Intronic	NA	0.43
	rs11568993	C>T (Cys/Cys)	Exon 13	NA	0.10
	rs4698803	T>A (Gly/Val)	Exon 19	NA	0.15
	rs4444903	A>G	5' UTR (61)	Reduced EGF production ^c	0.40
	rs11568972	C>A	Intronic	NA	0.32
	rs929446	C>T	Intronic	NA	0.40
	rs2074390	G>A	Upstream	NA	0.39
	rs6850557	G>A	Intronic	NA	0.30
<i>AREG/AREGB</i>	rs11942466	C>A	Intergenic	NA	0.34
	rs9996584	C>T	Intergenic	NA	0.39
	rs13104811	A>G	Intergenic	NA	0.34
	rs1353295	A>G	Intergenic	NA	0.32
	rs3913032	A>C	Intergenic	NA	0.51
	rs6447003	C>G	Intergenic	NA	0.28
	rs10034692	A>G	Intergenic	NA	0.27
	rs11725706	G>A	Intergenic	NA	0.14
	rs2132065	A>T	Intergenic	NA	0.18
	<i>EREG</i>	rs7687621	C>T	Intronic	NA
rs1017733		T>C	3' UTR	NA	0.24

Abbreviations: AREG, amphiregulin; AREGB, amphiregulin B; EGFR, epidermal growth factor receptor; EGF, epidermal growth factor; EREG, epiregulin; MAF, minor allele frequency (obtained in the present study); NA, not analysed.

^aLiu *et al.*, 2005; ^bMoriai *et al.*, 1994; ^cShahbazi *et al.*, 2002.

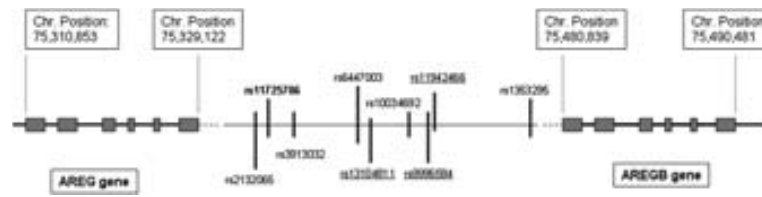


Figure 1. Genomic location of the *AREG* and *AREGB* genes and the intergenic tagging single-nucleotide polymorphisms included in the present study. The three SNPs associated with outcome are underlined.

rate-controlling procedure were applied. As a statistical validation method, a 10-fold Monte Carlo cross-validation procedure was carried out in order to assess the influence of individual observations on the results. At each iteration, association with outcome at univariate level was reanalyzed using only 90% of the observations. For each analysis, resampling was performed 100 times using outcome stratification when it was possible (response and OS).

RESULTS

Table 2 shows the patients' baseline characteristics. Fifty-four per cent of patients were treated in a second-line setting, whereas 32% and 14% were treated in a third-line and fourth-line setting, respectively. Fifty-five patients (74%) achieved disease control (complete response, partial response or stable disease) and 19 patients (26%) progressed. No statistically significant differences in disease control rate were observed between the different line settings ($P=0.871$) or the different irinotecan-based plus anti-EGFR therapies ($P=0.366$). Median PFS and OS were 7.7 months (95% CI: 6.4–9.4) and 18.8 months (95% CI: 11.2–21.5), respectively.

Clinical parameters and outcome

Supplementary Table 1 shows detailed information on the relationship between clinical parameters and response. The European Organisation for Research and Treatment of Cancer clinical risk classification correlated with response: 89% of patients in the low-risk group achieved a response, whereas only 40% of patients in the high-risk group showed response ($P=0.003$). In addition, an association between response and age was found. This finding is because of the significant relationship between age and the number of metastatic sites in our cohort ($P=0.02$; analysis of variance test)

Skin toxicity grade 2 or higher was present in 47 patients (64%). This adverse effect was also associated with response: 94% of patients with skin rash grade 2 or higher achieved disease control compared with only 41% of patients with skin rash grade 0/1 ($P=1.03e-06$). PFS was also significantly higher for those patients presenting severe skin rash toxicity: 9.4 months (95% CI: 6.9–10.3) for patients with skin rash grade 2 or more vs 5.0 months (95% CI: 3.5–8.7) for patients with grade 0/1 ($P=0.005$).

Genetic determinants and response

Table 3 shows the univariate analysis of the associations of the genetic variants with disease control. Only SNPs located in the *AREG* gene region correlated significantly with the disease control rate: rs11942466 C>A, rs9996584 C>T and rs13104811 A>G. For rs11942466 C>A, patients homozygous for the variant allele A showed a significantly lower disease control rate (25%) than those with a heterozygous A/C genotype (72%) or homozygous C/C genotype (85%) ($P=0.019$). For rs9996584 C>T, 89% of patients harbouring a T/T genotype achieved disease control, whereas 80% of patients with a T/C genotype and 60% of the patients harbouring a C/C genotype achieved disease control ($P=0.038$). And for rs13104811 A>G, all patients (100%) whose genotype was homozygous for the variant allele G responded compared

	N	(%)
Mean age years (range)	64	(40–85)
Sex		
Male	50	(68)
Female	24	(32)
Performance status		
0–1	53	(72)
2	21	(28)
Clinical risk classification		
Low risk	27	(37)
Intermediate risk	32	(43)
High risk	15	(20)
Anatomic site		
Right colon	16	(22)
Left colon	31	(42)
Rectal sigmoid	7	(9)
Rectal	20	(27)
Metastases development		
Synchronous	34	(46)
Metachronous	40	(54)
Metastatic sites involved		
1	34	(46)
2	29	(39)
3 or more	11	(15)
Previous lines of chemotherapy		
1	41	(54)
2	23	(32)
3 or more	10	(14)
Chemotherapy regime		
Irinotecan + cetuximab	55	(74)
FOLFIRI + cetuximab	12	(16)
Irinotecan + panitumumab	7	(10)

with only 70% of the patients whose genotype contained at least an A allele ($P=0.011$). Two other polymorphisms in the *AREG* gene region, rs1353295 A>G and rs3913032 C>A, showed a trend towards association with disease control rate.

After adjusting for all the relevant clinical variables in a logistic regression model, all three polymorphisms retained their statistical association with the disease control rate. For rs11942466 C>A the OR was 0.29 (95% CI: 0.07–0.94; $P=0.038$); for rs9996584 C>T, the OR was 3.77 (95% CI: 1.05–16.88; $P=0.041$); and for rs13104811 A>G, the OR could not be estimated as no patients with a GG genotype progressed ($P=0.006$). Also, rs1353295 A>G polymorphism that had a tendency towards association in the univariate analysis, when adjusted, showed a statistically significant P -value (0.045) (Table 3).

Table 3. Analyses of genetic variants and their association with disease control rate

Gene	SNP	N	Disease control rate				P-value, univariate	OR (95% CI)	P-value, multivariate
			CR, PR and SD		PD				
			N	(%)	N	(%)			
EGFR	rs712829 G>T	37	24	65	13	35	0.060*	Ref.	0.089
	G/G							3.27 (0.83–15.14)	
	G/T-T/T	37	31	84	6	16			
	rs721830 C>A						0.848	1.20 (0.27–6.24)	0.817
	C/C	53	40	75	13	25			
	C/A	20	14	70	6	30			
	A/A	1	1	100	0	0			
	rs2227983 G>A						0.390	0.88 (0.33–2.50)	0.807
	G/G	36	29	81	7	19			
	G/A	30	20	67	10	33			
A/A	8	6	75	2	25				
EGF	rs6533485 C>G						0.867	1.23 (0.47–3.38)	0.671
	G/G	23	16	70	7	30			
	G/C	34	27	79	7	21			
	C/C	17	12	71	5	29			
	rs11568993 C>T						0.921	Ref.	0.954*
	C/C	59	44	75	15	25		1.05 (0.20–6.74)	
	C/T	15	11	73	4	27			
	T/T	0							
	rs4698803 T>A						0.848	0.98 (0.25–4.13)	0.973
	T/T	53	40	75	13	25			
	T/A	20	14	70	6	30			
	A/A	1	1	100	0	0			
	rs4444903 A>G [#]						0.953	1.10 (0.41–3.10)	0.845
	A/A	26	19	73	7	27			
	A/G	37	28	76	9	24			
	A/A	11	8	73	3	27			
	rs11568972 A>C						0.637	1.50 (0.46–5.47)	0.508
	A/A	32	24	75	8	25			
	A/C	37	26	70	11	30			
	C/C	5	5	100	0	0			
rs929446 C>T [#]						0.953	1.10 (0.41–3.10)	0.845	
C/C	26	19	73	7	27				
C/T	37	28	76	9	24				
T/T	11	8	73	3	27				
rs2074390 G>A						0.805	1.14 (0.43–3.18)	0.788	
G/G	28	20	71	8	29				
G/A	35	27	77	8	23				
A/A	11	8	73	3	27				
rs6850557 G>A						0.494	1.59 (0.49–5.84)	0.449	
G/G	34	25	73	9	27				
G/A	35	25	71	10	27				
A/A	5	5	100	0	0				
AREG	rs11942466 C>A						0.019	0.29 (0.07–0.94)	0.038
	C/C	27	23	85	4	15			
	C/A	43	31	72	12	28			
	A/A	4	1	25	3	75			
	rs9996584 C>T						0.038	3.77 (1.05–16.88)	0.041
	C/C	25	15	60	10	40			
	C/T	40	32	80	8	20			
	T/T	9	8	89	1	11			
	rs13104811 A>G						0.011**	Ref.	0.006
	A/A-A/G	64	45	70	19	30		NA	
	G/G	10	10	100	0	0			
	rs1353295 A>G						0.053**	Ref.	0.045
	A/A-A/G	68	49	72	19	28		NA	
	G/G	6	6	100	0	0			
	rs3913032 C>A						0.071	2.41 (0.93–7.13)	0.069
	C/C	19	12	63	7	37			
	C/A	37	27	73	10	27			
	A/A	18	16	89	2	11			
	rs6447003 C>G						0.250	3.10 (0.88–13.95)	0.081
	C/C	37	26	70	11	30			
C/G	33	25	76	8	24				
G/G	4	4	100	0	0				
rs10034692 A>G						0.594	1.63 (0.57–5.49)	0.371	
G/G	40	29	72	11	28				
A/G	28	21	75	7	25				
A/A	6	5	83	1	17				
rs11725706 G>A						0.650	0.68 (0.16–2.70)	0.586	
G/G	56	41	73	15	23				
G/A	16	14	87	2	13				
A/A	2	0	0	2	100				
rs2132065 A>T						0.615	0.86 (0.27–2.83)	0.803	
A/A	50	37	74	13	26				
A/T	21	17	81	4	19				
T/T	3	1	33	2	67				

Table 3. (Continued)

Gene	SNP	N	Disease control rate				P-value, univariate	OR (95% CI)	P-value, multivariate
			CR, PR and SD		PD				
			N	(%)	N	(%)			
EREG	rs1017733 T>C						0.399	0.54 (0.16–1.75)	0.303
	T/T	40	31	78	9	22			
	T/C	32	23	72	9	28			
	C/C	2	1	50	1	50			
	rs7687621 C>T						0.463	0.66 (0.20–2.18)	0.484
	C/C	43	33	77	10	23			
C/T	29	21	73	8	28				
T/T	2	1	50	1	50				

Abbreviations: AREG, amphiregulin; CI, confidence interval; CR, complete response; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; EREG, epiregulin; OR, odds ratio; PD, progressive disease; PR, partial response; Ref., referent; SD, stable disease.
All results shown are for the additive model unless otherwise stated: *dominant model; **recessive model. #Indicates linkage disequilibrium between the SNPs.

Genetic determinants and PFS

A significant association was evidenced for SNPs in two genes: rs11942466 C>A in the AREG gene region and rs712829 G>T in the EGFR gene. For rs11942466 C>A, patients harbouring the C/C or C/A genotypes had a median PFS of 8.4 months (95% CI: 6.6–9.4) and patients harbouring an A/A genotype showed a median PFS of 3.0 months (95% CI: not estimable) (P=0.006). For rs712829 G>T, the median PFS was 6.4 months (95% CI: 5.1–9.4) for patients with a G/G genotype, 9 months (95% CI: 6.6–9.9) for patients with a G/T genotype and 11.6 months (95% CI: not estimable) for the patients with a T/T genotype (P=0.027).

In the multivariate analysis after adjusting for the clinical variables, these polymorphisms remained statistically associated with the PFS. For rs11942466 C>A, the hazard ratio was 6.03 (95% CI: 1.89–19.18; P=0.009), and for rs712829 G>T, the hazard ratio was 0.66 (95% CI: 0.46–0.96; P=0.025) (Table 4).

Genetic determinants and OS

The two SNPs associated with PFS also showed a significant association with OS. In addition, rs9996584 C>T located in the AREG gene region was associated with OS. Regarding rs11942466 C>A, patients harbouring a C/C or a C/A genotype had a median OS of 19.6 months (95% CI: 11.9–22.0) compared with 5.9 months (95% CI: not estimable) for patients harbouring an A/A genotype (P=0.002). For rs9996584 C>T, patients with a C/C genotype had a median OS of 10 months (95% CI: 7.9–16.3) compared with 20 months (95% CI: 13.0–24.4) and 26 months (95% CI: not estimable) for patients with C/T and T/T genotypes, respectively (P=0.009) (Table 4). The rs10034692 A>G polymorphism also located in the AREG gene region showed a trend towards association with OS: patients homozygous for the A allele had a median OS of 20.2 months (95% CI: 19.0–26.9), whereas patients harbouring at least a G allele had a median OS of 11.0 months (95% CI: 9.7–19; P=0.067; Supplementary Figure 1).

In the EGFR gene, for rs712829, patients with a G/G genotype had a median OS of 11.0 months (95% CI: 9.3–22.1), patients with a G/T genotype had a median of 19.7 months (95% CI: 12.0–26.0) and patients with a T/T genotype showed a median of 27.3 months (95% CI: not estimable) (P=0.036).

In the multivariate analysis, the three SNPs retained their significance when adjusted for clinical variables. The hazard ratio was 10 (95% CI: 3.01–33.64; P=0.001) for rs11942466 C>A, 0.55 (95% CI: 0.35–0.87; P=0.009) for rs9996584 C>T and 0.67 (95% CI: 0.45–1.00; P=0.047) for rs712829 G>T (Table 4).

In multiple testing including all the analysed SNPs, none of them remained statistically associated with the outcome parameters analysed. For the 10-fold Monte Carlo cross-validation procedure, out of the 100 cross-validation iterations, variants

rs13104811, rs11942466 and rs9996584 were found significant 100, 81 and 52 times, respectively, in the response analysis. SNPs found to be significantly associated with PFS and OS also achieved significance in the cross-validation procedure with high frequency (rs11942466: 97 and 98 times; rs712829: 71 and 61 times, respectively). The rs9996584 SNP also showed association with OS in most of the 10-fold iterations (97 times).

DISCUSSION

In the present work, we found that common variants in the AREG gene region were associated with the outcome of refractory mCRC patients treated with anti-EGFR plus irinotecan-based therapy. Three SNPs located in the AREG gene region (rs11942466 C>A, rs13104811 A>G and rs9996584 C>T) predicted disease control rate, and all the three remained significant in the multivariate analysis. AREG rs11942466 C>A and rs9996584 C>T were also associated with OS. In addition, we found that the functional polymorphism rs712829 G>T in the EGFR gene was associated with PFS and OS.

Previous studies have evaluated functional polymorphisms in the EGFR and EGF genes as predictive and prognostic biomarkers. Findings from these works that have been obtained in different clinical settings are not consistent. Here we comment only on pharmacogenetic studies performed in mCRC patients treated with anti-EGFR therapies.

In 2008, an Italian group performed a pharmacogenetic profile for cetuximab plus irinotecan therapy in 110 mCRC patients, regardless of their KRAS status.¹⁴ They showed that one polymorphism in the EGFR gene (CA repeats in intron 1) and one in the EGF gene (EGF 61, rs4444903 A>G) were associated with survival. Later on, Lurje *et al.*²³ conducted a study in 130 patients treated with cetuximab monotherapy, also regardless of the KRAS status. They found that the EGF 61A>G and the EGFR R497K polymorphisms were associated with a longer PFS, but that only EGFR R497K remained significant after multivariate analysis. In a subsequent study that included 42 KRAS wild-type patients treated with irinotecan/cetuximab in a third-line setting, a significant association between EGF 61 polymorphism and response and survival was reported.²⁴ Dahan *et al.*²⁵ reported an association of a variant in the EGFR gene (-191C>A rs712830) with the time to progression in the univariate analysis in their KRAS wild-type subgroup of 34 patients treated with salvage irinotecan-cetuximab. However, the significance of this association was not retained in the multivariate analysis. More recently, Hsieh *et al.*¹¹ found an association of rs2227983 G>A polymorphism (R497K/R521K) in the EGFR gene with response rate, PFS and OS in 112 KRAS wild-type mCRC patients treated with first-line 5-fluorouracil + oxaliplatin-cetuximab.

Table 4. Survival results of the multivariate cox proportional hazards models for significant germline variants

Gene	SNP	Progression-free survival				Overall survival			
		Months	HR	95% CI	P-value	Months	HR	95% CI	P-value
AREG	rs11942466 C>A								
	C/C-C/A	8.3	6.03	Referent (1.89–19.18)	0.009	19.6	10.0	Referent (3.01–33.64)	0.001
	A/A	3.0				5.9			
	rs9996584 C>T								
	C/C	5.5				10.0			
C/T	8.3	1.15	(0.70–1.88)	0.583	20.2	0.55	(0.35–0.87)	0.009	
	T/T	9.3				26.0			
EGFR	rs712829 G>T								
	G/G	6.4				10.9			
	G/T	9.0	0.66	(0.46–0.96)	0.025	19.6	0.67	(0.45–1.00)	0.047
	T/T	11.6				27.3			

Abbreviations: AREG, amphiregulin; CI, confidence interval; EGFR, epidermal growth factor receptor; HR, hazard ratio.

These studies have been unable to clearly define the role of the functional polymorphisms as biomarkers in the *EGFR* and *EGF* genes. Some results that suggested an association between a genetic marker and outcome obtained by a research group could not be replicated in other studies, including the present work. In our set of mCRC patients with wild *KRAS* and *BRAF* genotypes, the associations described for rs2227983 G>A, rs4444903 A>G and rs712830 C>A in the *EGFR* gene could not be confirmed, and only a correlation with survival has been assessed for the functional EGFR rs712829 G>T polymorphism. Our results are in keeping with the not yet established role of the functional polymorphisms in *EGFR* and *EGF* genes as relevant biomarkers for anti-EGFR treatment.

AREG and EREG are EGFR ligands that have recently gained interest as novel biomarkers of response in patients treated with anti-EGFR therapies. The vast majority of the studies have analysed AREG and EREG mRNA expression in tumour samples of mCRC patients.^{17,26,27} They all agree that patients with tumours that have high gene expression levels of AREG and EREG are more likely to have better outcome on anti-EGFR therapy. Recently, in a preclinical model, Oliveras-Ferreros *et al.*¹⁹ hypothesised that the levels of mRNA of AREG and EREG could be useful dynamic predictors of resistance to cetuximab treatment in *KRAS* wild-type tumour cell-line models.

In this exploratory study, we identified significant associations between outcome and common genetic variants in the intergenic region located between two linked genes (*AREG* and *AREGB*) in the long arm of chromosome 4 (4q13.3).

The mechanism that might explain the predictive and prognostic value of SNPs in this intergenic region remains unknown. One explanation could be that these polymorphisms are in linkage disequilibrium with functional genetic variants located in the AREG exonic and regulatory regions. Using the 1000 Genome database, we have identified several polymorphisms in high linkage disequilibrium ($r^2 > 90$) with the studied SNPs, all of them located intergenically. The lack of complete data regarding the minor allele frequency of intragenic variations of AREG hampers confirmation of this hypothesis. Another plausible explanation for our results could come from recent data revealed by the ENCODE project.²⁸ Findings from this project indicate that much of the functional non-coding DNA is involved in regulating the expression of coding genes, and that the expression of each coding gene is controlled by multiple regulatory sites located both close to and far from the gene. The association of the intergenic SNPs with clinical outcome in our set of patients could be attributed to some functional role of these non-coding DNA. *In silico* analysis (RegulomeDB and F-SNP databases) showed that the rs9996584 C>T polymorphism may affect regulation at a

transcriptional level because it alters a PAX1 Motif.²⁹ For rs11942466 C>A and rs13014811 A>G, a functional role in the transcriptional regulation has been proposed (F-SNP database). Additional studies correlating the levels of AREG expression with potentially functional variants in the *AREG* genes would help to prove these hypotheses.

To our knowledge, the present study is the first to identify SNPs in the AREG gene region as potential biomarkers for anti-EGFR therapies. This cohort includes a small number of patients treated in different line settings; however, it represents a large homogeneous cohort in terms of *KRAS* and *BRAF* status and chemotherapy combination compared with the previous published works. This work proposes polymorphisms located in the AREG/AREGB intergenic region as potential novel biomarkers for outcome in mCRC patients treated with anti-EGFR therapies plus irinotecan-based chemotherapy. The study does not include correction for multiple testing, and there is no validation of the results in an independent series; however, the 10-fold cross-validation analysis performed supports the robustness of the findings. Therefore, the hypothesis-generation data of this study warrant further validation in a larger and independent cohort.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (FIS/1101711, CM11/00102 to Ana Sebio). We thank Carolyn Newey for English language editing.

REFERENCES

- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 337–345.
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJS, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 1201–1208.
- Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1408–1417.
- Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Taberero J, Burkes R, Barugel M *et al.* Randomized phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 4697–4705.
- Lenz HJ. Anti-EGFR mechanism of action: antitumor effect and underlying cause of adverse events. *Oncology (Williston Park)* 2006; **20**: 5–13.

- 6 Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med* 2011; **12**: 419–432.
- 7 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ *et al*. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; **26**: 1626–1634.
- 8 De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G *et al*. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; **11**: 753–762.
- 9 Liu W, Innocenti F, Wu MH, Desai AA, Dolan ME, Cook Jr EH *et al*. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* 2005; **65**: 46–53.
- 10 Moriai T, Kobrin MS, Hope C, Speck L, Korc M. A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10217–10221.
- 11 Hsieh YY, Tzeng CH, Chen MH, Chen PM, Wang WS. Epidermal growth factor receptor R521K polymorphism shows favorable outcomes in KRAS wild-type colorectal cancer patients treated with cetuximab-based chemotherapy. *Cancer Sci* 2012; **103**: 791–796.
- 12 Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999; **274**: 13176–13180.
- 13 Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, Fakhoury H, Fryer AA, Strange RC *et al*. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet* 2002; **359**: 397–401.
- 14 Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, Canestrari E, Santini D, Catalano V *et al*. Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 1427–1434.
- 15 Hu-Lieskovan S, Vallbohmer D, Zhang W, Yang D, Pohl A, Labonte MJ *et al*. EGF61 polymorphism predicts complete pathologic response to cetuximab-based chemoradiation independent of KRAS status in locally advanced rectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 5161–5169.
- 16 Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 553–563.
- 17 Jacobs B, De Roock W, Plesseaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J *et al*. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5068–5074.
- 18 Ohchi T, Akagi Y, Kinugasa T, Kakuma T, Kawahara A, Sasatomi T *et al*. Amphiregulin is a prognostic factor in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2012; **32**: 2315–2321.
- 19 Oliveras-Ferreros C, Massaguer Vall-Llovera A, Vazquez-Martin A, Salip DC, Queralt B *et al*. Transcriptional upregulation of HER2 expression in the absence of HER2 gene amplification results in cetuximab resistance that is reversed by trastuzumab treatment. *Oncol Rep* 2012; **27**: 1887–1892.
- 20 Kohne CH, Cunningham D, Di Costanzo F, Glimelius B, Blijham G, Aranda E *et al*. Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol* 2002; **13**: 308–317.
- 21 Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R *et al*. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; **45**: 228–247.
- 22 Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr* 1974; **AC-19**: 716–723.
- 23 Luije G, Nagashima F, Zhang W, Yang D, Chang HM, Gordon MA *et al*. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 7884–7895.
- 24 Garm Spindler KL, Pallisgaard N, Rasmussen AA, Lindebjerg J, Andersen RF, Cruger D *et al*. The importance of KRAS mutations and EGF61A>G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009; **20**: 879–884.
- 25 Dahan L, Norguet E, Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Gasmii M, Nanni I *et al*. Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011; **11**: 496.
- 26 Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S *et al*. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 3230–3237.
- 27 Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, Sfakianaki M, Pega F, Kalikaki A *et al*. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in >I=2 line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. *PLoS One* 2011; **6**: e15980.
- 28 The ENCODE project consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012; **489**: 57–74.
- 29 Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A *et al*. TRANSFAC[®] and its module TRANSCompel[®]: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**(Database issue): D108–D110.

Supplementary Information accompanies the paper on the The Pharmacogenomics Journal website (<http://www.nature.com/tpj>)

3.1.2.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer de recto localmente avanzado

En este apartado se detalla el trabajo efectuado en el grupo de pacientes con el diagnóstico clínico de cáncer de recto localmente avanzado:

3.1.2.1.- EGFR ligands and DNA repair genes: genomic predictors of complete response after capecitabine-based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer

The Pharmacogenomics Journal 2014 Jul 15. doi:10.1038/tpj.2014.33

Ana Sebio, Juliana Salazar, David Páez, Antoni Berenguer-Llargo, Elisabeth del Río, MaríaTobeña, Marta Martín-Richard, Ivana Sullivan, Eduard Targarona, Josep Balart, Montserrat Baiget , Agustí Barnadas.

Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain



Resumen

La activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico por radiaciones ionizantes da lugar a un incremento de la proliferación celular y actúa como un mecanismo de radioresistencia. La quimiorradioterapia neoadyuvante es el tratamiento estándar para el tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado y hasta la fecha no se han encontrado biomarcadores de respuesta. Hemos analizado polimorfismos en el EGFR y sus ligandos, genes de reparación del ADN y en el gen de la timidilatocsintasa en 84 pacientes con estadios II y III de cáncer rectal tratados con capecitabina y radioterapia neoadyuvante. El polimorfismo rs11942466 en la región génica de la anfiregulina se asoció con la respuesta completa patológica (ypCR) (OR: 0.26; 95% CI: 0.06-0.79; $p=0.014$). El polimorfismo en el gen ERCC1 también se correlacionó con la ypCR ya que ningún paciente con un genotipo CC alcanzó ypCR; $p=0.023$. Este es el primer trabajo en proponer variantes en los genes de la anfiregulina y el ERCC como prometedores biomarcadores predictivos de ypCR en cáncer de recto.

ORIGINAL ARTICLE

EGFR ligands and DNA repair genes: genomic predictors of complete response after capecitabine-based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer

A Sebío¹, J Salazar^{2,3}, D Pérez¹, A Berenguer-Llargo⁴, E del Río², M Tobeña¹, M Martín-Richard¹, I Sullivan¹, E Targarona⁵, J Balart⁶, M Baiget^{2,3} and A Barnadas¹

Epidermal growth factor receptor (EGFR) activation by radiation leads to increased cell proliferation and acts as a radioresistance mechanism. Neoadjuvant chemoradiation is the standard of care for locally advanced rectal cancer, and to date, no biomarkers of response have been found. We analyzed polymorphisms in the EGFR and its ligands, DNA repair genes and the thymidylate synthase in 84 stages II and III rectal cancer patients treated with neoadjuvant capecitabine plus radiotherapy. The rs11942466 polymorphism in the amphiregulin (AREG) gene region was associated with a pathological complete response (ypCR) (odds ratio: 0.26; 95% confidence interval: 0.06–0.79; $P=0.014$). The rs11615 C>T polymorphism in the ERCC1 gene also correlated with the ypCR as no patients with a C/C genotype achieved ypCR; $P=0.023$. This is the first work to propose variants within the AREG and the ERCC1 genes as promising predictive biomarkers of ypCR in rectal cancer.

The *Pharmacogenomics Journal* advance online publication, 15 July 2014; doi:10.1038/tpj.2014.33

INTRODUCTION

Preoperative chemoradiation (CRT) and total mesorectal excision have become the standard of care for locally advanced rectal carcinoma. This combined approach reduces local recurrence rate and improves disease-free survival.¹ The absence of residual neoplasia in the resected specimen after chemoradiotherapy, known as pathological complete response (ypCR), has been reported in approximately 15–18% of the patients and correlates with a better outcome.²

Until recently, the most widely used cytotoxic agent for neoadjuvant CRT was 5-fluorouracil (5-FU). However, in recent years, the oral fluoropyrimidine capecitabine has become a standard treatment.³ Capecitabine provokes antineoplastic activity by misincorporating fluoronucleotides into the RNA and DNA and inhibiting nucleotide synthetic enzyme thymidylate synthase (TS).⁴ The most studied polymorphisms in the TS gene are a variation in the number of a 28-base pair tandemly repeated (VNTR) sequence in 5′ untranslated region and a G>C change in TS alleles with three repeats.^{5,6} Both these TS polymorphisms have been associated with the response to neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer.^{7–9}

In the neoadjuvant setting, capecitabine is used as a radiotherapy sensitizer. Radiotherapy uses ionizing radiation to induce cellular damage, causing both single- and double-strand breaks in the DNA molecule. This damage is repaired by several genes. ERCC1 (the excision repair cross-complementing 1) and ERCC2/XPD are DNA repair genes that participate in nucleotide excision repair pathway. Polymorphisms within these genes have been analyzed as biomarkers of response to neoadjuvant chemoradiotherapy in

rectal cancer; however, to date no correlation has been found. Another gene, XRCC1 (the X-ray cross complementing group 1 gene), has an important role in the base excision repair pathway. Within this gene, the functional polymorphism Arg399Gln has been associated with the response to preoperative CRT based on 5-FU in rectal cancer patients.^{7–9}

To protect eukaryotic cells from the radiation-induced damage, an additional cellular mechanism is the activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that ionizing radiation can simulate the action of EGFR ligands and initiate EGFR signaling, thus increasing cell proliferation and survival.¹⁰ In the EGFR pathway cascade, KRAS mutations are a predictive factor of non-response to anti-EGFR therapies in patients with metastatic colorectal cancer. The effect of KRAS mutations on outcome after chemoradiotherapy in rectal cancer has been evaluated by several groups. However, a recent meta-analysis has shown that these KRAS mutations do not influence response or survival following neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer.¹¹ Other genetic variations in the EGFR gene and its ligand epidermal growth factor (EGF) as markers of response to chemoradiotherapy in rectal cancer have been scarcely studied. In the promoter region of the EGFR gene, the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) –216G>T and –191C>A influence mRNA expression, and –191C>A polymorphism has been correlated with the response to chemoradiotherapy based on Tegafur + Uracil.^{12,13} In the EGFR gene, R521K G>A alters ligand binding to EGFR, and the variant allele of this SNP has been associated with a higher response rate to FOLFOX-cetuximab.^{14,15} The EGF A61G polymorphism affects the *in vitro* and *in vivo* levels

¹Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³U-705 CIBERER, Barcelona, Spain; ⁴IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain; ⁵Department of Surgery, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain and ⁶Department of Radiotherapy, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr D Pérez, Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret, 167, Barcelona 08025, Spain.

E-mail: dperez@santpau.cat

Received 3 January 2014; revised 31 March 2014; accepted 22 May 2014

of the natural ligand of EGFR and has been associated with the ypCR in rectal cancer patients treated with cetuximab-based CRT.^{16,17} Polymorphisms in other EGFR ligands, such as amphiregulin (AREG) and epiregulin (EREG), have not been explored as markers for neoadjuvant treatment in rectal cancer patients.

As biomarkers to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer are lacking, the aim of this study was to explore the potential role of SNPs in the EGFR gene and its ligands (EGF, AREG and EREG) as biomarkers of response in this setting. Additionally, we analyzed the most widely studied polymorphisms in the TS and DNA repair genes in a homogeneous cohort of rectal cancer patients treated with preoperative radiation concomitantly with capecitabine.

MATERIALS AND METHODS

Selected population and treatment protocol

A total of 84 patients histologically diagnosed with stage II and III rectal adenocarcinoma were included in the study. Eligibility criteria for inclusion were: > 18 years old, an Eastern Cooperative Oncology Group score of < 3; adequate bone marrow, renal and liver function, and no previous pelvic radiotherapy. Initial work-up included: colonoscopy, rectal examination, pelvic magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography scan, endorectal ultrasonography, and determination of the carcinoembryonic antigen.

The preplanned radiotherapy dose was 45 Gy given at 1.8 Gy per session, 5 days per week for 5 weeks. Concomitantly with radiotherapy, patients received capecitabine 825 mg m⁻² 12 h⁻¹ 5 days a week. A pelvic MRI was performed after chemoradiotherapy to evaluate response. Surgical resection was performed within 6–8 weeks after preoperative treatment. Adjuvant treatment was left to the discretion of the treating physician. All patients provided written informed consent, and the study was approved by the institutional ethics committee.

Response evaluation

Clinical data were obtained from clinical records. Response to treatment was measured pathologically by the tumor regression grade (TRG) and classified according to Mandard's scale as: grade 1 (TRG1) when no carcinoma was found in the tumor specimen; grade 2 (TRG2) when residual microfoci of carcinoma were present; grade 3 (TRG3) when there was a partial regression with clear evidence of residual cancer cells but predominant fibrosis; and grade 4 (TRG4) when the residual cancer cells outgrew fibrosis.¹⁸ Tumor downstaging was evaluated by comparing pretreatment T and N with the pathological stage of the surgical specimen, following the Seventh edition of the AJCC cancer staging manual.

Genetic studies

We studied 28 polymorphisms in genes involved in the fluoropyrimidine metabolism (TS), the DNA repair (ERCC1, XPD, XRCC1) and the EGFR pathway (EGFR, EGF, AREG and EREG). For the TS, ERCC1, XPD, XRCC1 and EGFR genes, functional polymorphisms were selected from the literature. TagSNPs in the AREG, EREG and EGF genes were chosen using the HapMap genome browser based on the CEU population (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi/iperl/gbrowse/hapmap27_836/) and Haploview software 4.2 based on two predefined criteria: (i) pairwise coefficient of determination (r^2) cutoff of > 0.80, and (ii) minor allele frequency > 0.10. For the AREG gene, the selected TagSNPs covered a region of 180 Kb and were all located in the AREG–AREGB intergenic region (Table 1). All polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium, except for rs10034692 ($P > 0.05$).

Genomic DNA was automatically extracted from blood samples using the salting out procedure (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany) and quantified using the BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Twenty-four polymorphisms were analyzed using the 48.48 dynamic array chips on the BioMark system (Fluidigm, San Francisco, CA, USA) and TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were analyzed using the Fluidigm SNP Genotyping Analysis software. The polymorphisms located in the TS gene and EGFR Sp1 binding

Table 1. Polymorphisms selected for genotype

Gene	SNP	Substitution	Location	Function	MAF	
EGFR	rs712829	G>T (-216)	5'UTR	30 % Increased promoter activity ¹²	0.40	
	rs712830	C>A (-191)	5'UTR	Reduction of mRNA expression ¹²	0.11	
	rs2227983	G>A (R497K/R521K)	Exon 13	Reduction in ligand binding, growth stimulation, tyrosine kinase activation, proto-oncogen induction ¹⁴	0.25	
EGF	rs6533485	C>G	Intronic	NA	0.46	
	rs11568993	C>T (Cys>Cys)	Exon 13	NA	0.11	
	rs4698803	T>A (Gly>Val)	Exon 19	NA	0.15	
	rs4444903	A>G	5'UTR (61)	Reduced EGF production ¹⁷	0.42	
	rs11568972	C>A	Intronic	NA	0.35	
	rs929446	C>T	Intronic	NA	0.42	
	rs2074390	G>A	Upstream	NA	0.40	
	rs6850557	G>A	Intronic	NA	0.35	
	AREG/AREGB	rs11942466	C>A	Intergenic	NA	0.45
		rs28635876	C>T	Intergenic	NA	0.44
rs13104811		A>G	Intergenic	NA	0.46	
rs1353295		A>G	Intergenic	NA	0.37	
rs3913032		A>C	Intergenic	NA	0.40	
rs6447003		C>G	Intergenic	NA	0.35	
rs10034692		A>G	Intergenic	NA	0.24	
rs11725706		G>A	Intergenic	NA	0.15	
rs2132065		A>T	Intergenic	NA	0.20	
rs7687621		C>T	Intronic	NA	0.18	
EREG	rs1017733	T>C	3' UTR	NA	0.19	
	rs11615	C>T (118Asn>Asn)	Exon 4	Alters mRNA expression and protein levels ³¹	0.35	
ERCC1	rs3212986	G>T	3'UTR	Suspected to affect mRNA stability ³²	0.24	
	rs13181	A>C (751Lys>Gln)	Exon 23	Lower DNA repair capacity after X-irradiation ³³	0.32	
XPD (ERCC2)	rs25487	G>A (399Arg>Gln)	Exon 10	Decrease in DNA repair and ionizing-radiation sensitivity ³⁴	0.33	
XRCC1	—	—	—	—	—	
TS	VNTR	—	5'UTR	3R sequence greater translational efficiency than 2R ⁵	0.44	
	3R allele	G>C	5'UTR	Reduced transcriptional activity ⁷	—	

Abbreviations: AREG, amphiregulin; AREGB, amphiregulin B; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERCC1, excision repair cross complement 1; EREG, epiregulin; MAF, minor allele frequency in this cohort; NA, not analyzed; SNP, single-nucleotide polymorphism; TS, thymidylate synthase; UTR, untranslated region; XPD, xeroderma pigmentosum D; XRCC1, X-ray repair complementing 1.

Table 2. Baseline clinical characteristics

	N	(%)
Mean age, years (range)	67.6 (80–42)	
Sex		
Male	55	65.5
Female	29	34.5
Performance status		
0	35	41.7
1	46	54.8
2	3	3.6
Tumor stage		
II	23	27.4
III	61	72.6
Pretreatment CEA		
< 5.0 ng ml ⁻¹	32	38
> 5.0 ng ml ⁻¹	34	40.5
NA	18	21.5
Surgery procedure		
Lower anterior resection	60	71.5
Ultra low anterior resection	7	8.3
Abdominoperineal resection	16	19
TEM	1	1.2
Adjuvant chemotherapy		
None	28	33.3
Capecitabine	34	40.5
FOLFOX	22	26.2

Abbreviations: CEA, carcinoembryonic antigen; NA, not analyzed; TEM, transanal endoscopic microsurgery.

site (-216G>T and -191C>A) were analyzed by direct automated DNA sequencing on an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

Statistical analysis

For each SNP, deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were assessed using an exact test for two allele markers as implemented in the R genetics package.¹⁹ The statistical associations between clinical data and ypCR were evaluated using a t-test for continuous variables and a Fisher's exact test for categorical variables. Log-likelihood ratio tests (LRT) derived from logistic regression models were performed to test the association of the polymorphisms with the ypCR at a 5% significance level. The corresponding odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were used as effect measures of these associations. Additive, dominant and recessive inheritance models were considered as long as there was a minimum of five patients per group available for analysis. Co-dominant inheritance model that considers the three genotypes was also analyzed. For each SNP, the best model was chosen according to the Akaike's Information Criteria.²⁰ The association of the polymorphisms with the ypCR was evaluated both in a univariate and a multivariate model. The covariates included in the multivariate analyses were age at diagnosis, gender, performance status, completeness of treatment, initial carcinoembryonic antigen level and initial stage. To assess the independence of the effects found, a stepwise forward automatic selection algorithm was carried out on the SNPs that showed a *P*-value < 0.25 in the adjusted model using the Akaike's Information Criteria for model selection. Only SNPs with a LRT *P*-value < 0.05 were kept in the final model. For multiple contrast adjustment, a permutation strategy was applied to the truncated rank product of *P*-values derived from the univariate models as described by Dubridge et al.²¹ In the permutation scheme, the selection of the inheritance model was taken into account. Significance of the truncated rank product was assessed using 10 000 permutations. The truncation point was defined as the number of markers showing a *P*-value < 0.05 in the univariate analysis. Additionally, recursive partitioning was applied to

stratify patients according to their probability of achieving a ypCR. A conditional inference classification tree was built with the SNPs that retained association in the adjusted models as described and implemented in the R package.²² As criterion for split creation, the null hypothesis of independence between any of the SNPs and the ypCR was tested and multiplicity adjusted Monte-Carlo *P*-values were computed based on 10 000 resamples. A split was created only when the adjusted *P*-value was < 5%.

RESULTS

Clinical results

Table 2 shows patients baseline clinical characteristics. Seventy-nine patients (94%) completed the preplanned chemoradiotherapy treatment. Seventy-nine patients (94%) underwent R0 resection, 4 (4.8%) underwent R1 microscopically incomplete resection and one patient (1.2%) had an R2 macroscopically incomplete resection.

After CRT, ypCR or no evidence of residual carcinoma (TRG1) in the pathological specimen was achieved in 17 patients (20.2%). Residual microfoci (TRG2) were also found in 17 patients (20.2%); partial regression with clear evidence of residual cancer cells but predominant fibrosis (TRG3) was present in 23 patients (27.4%) and residual cancer cells outgrowing fibrosis (TRG4) in 27 patients (32.1%). No disease progression was observed during treatment in any patient. From the recorded baseline clinical characteristics, only the initial stage at diagnosis correlated with ypCR; stage II patients were more likely to achieve ypCR than stage III patients (*P* = 0.014).

Pathological tumor downstaging was obtained in 55 patients (65.5%), while radiological response measured by pelvic MRI prechemoradiotherapy and postchemoradiotherapy was achieved in 45 patients (53.5%). There was a correlation between radiological response and downstaging. Patients with a radiological response were more likely to achieve pathological downstaging than those who did not show response in the MRI (*P* = 0.020). However, radiological response did not predict ypCR; a total of 11 patients (24.4%) that showed partial response by MRI achieved ypCR compared with 3 patients (11.5%) showing stable disease by MRI; (*P* = 0.23).

The median follow-up of this cohort was 25 months (range 3–89), and during this period recurrence was observed in 12 patients (14.3%). Because of the low number of recurrences, the association of these SNPs with progression-free survival, overall survival and survival for patients achieving complete has not been tested.

Genetic determinants and complete response

Table 3 shows univariate analyses of the associations between the studied polymorphisms and the pathologic complete response. Three SNPs showed a significant association; the rs11942466 C>A in *AREG* gene region and the rs11615 T>C and rs3212986 G>T in the *ERCC1* gene. For rs11942466 C>A in the *AREG* gene region, 35.7% of the patients with a C/C genotype achieved a ypCR compared with 19.4% of the patients with a heterozygous genotype and none of the patients with an A/A genotype (*P* = 0.0018). For rs11615 in the *ERCC1* gene, 30.6% of the patients with a T/T genotype achieved a ypCR, whereas only 16.2% of the patients with a T/C and no patients with a C/C genotype responded (*P* = 0.0235). In the 3' untranslated region of the *ERCC1* gene, the rs3212986 polymorphism was also associated with the ypCR, as 29.2% of the patients homozygous for the G allele achieved a ypCR compared with 9.7% of the patients harboring the G/T genotype and no patients harboring the T/T genotype (*P* = 0.0096). For multiple test adjustment, a permutation approach, based on the truncated rank product of marginal *P*-values < 0.05, was performed. An adjusted *P*-value of 0.07 was associated for these SNPs when considered all together.

Table 3. Univariate analyses of genetic variants and their association with pathological complete response

Gene	rs number	Model	Genotype	TRG 2-4/TRG 1	OR (95% CI)	LRT P-value
EGFR	rs712829	Co-dominant	G/G	25 (75.8%)/8 (24.2%)	Ref.	0.5558
			G/T	27 (79.4%)/7 (20.6%)	0.81 (0.25, 2.58)	
			T/T	15 (88.2%)/2 (11.8%)	0.42 (0.06, 1.94)	
EGFR	rs712930	Dominant	C/C	53 (77.9%)/15 (22.1%)	Ref.	0.3705
			C/A-A/A	14 (87.5%)/2 (12.5%)	0.50 (0.07, 2.08)	
			G/G	40 (87.0%)/6 (13.0%)	Ref.	
EGFR	rs2227983	Dominant	G/G	27 (71.1%)/11 (28.9%)	2.72 (0.92, 8.72)	0.0706
			G/A-A/A	19 (82.6%)/4 (17.4%)	Ref.	
			G/C	34 (77.3%)/10 (22.7%)	1.40 (0.41, 5.65)	
EGF	rs6533485	Co-dominant	C/C	14 (82.4%)/3 (17.6%)	1.02 (0.18, 5.35)	0.8365
			C/C	52 (80.0%)/13 (20.0%)	Ref.	
			C/T-T/T	15 (78.9%)/4 (21.1%)	1.07 (0.27, 3.55)	
EGF	rs11568993	Dominant	T/T	49 (81.7%)/11 (18.3%)	Ref.	0.9203
			T/A-A/A	18 (75.0%)/6 (25.0%)	1.48 (0.46, 4.53)	
			A/A	21 (84.0%)/4 (16.0%)	Ref.	
EGF	rs4698803	Dominant	A/G	36 (76.6%)/11 (23.4%)	1.60 (0.48, 6.37)	0.7134
			G/G	10 (83.3%)/2 (16.7%)	1.05 (0.13, 6.38)	
			A/A	26 (78.8%)/7 (21.2%)	Ref.	
EGF	rs11568972	Co-dominant	A/C	34 (79.1%)/9 (20.9%)	0.98 (0.32, 3.08)	0.8334
			C/C	7 (87.5%)/1 (12.5%)	0.53 (0.03, 3.76)	
			C/C	21 (84.0%)/4 (16.0%)	Ref.	
EGF	rs929446	Co-dominant	C/T	36 (76.6%)/11 (23.4%)	1.60 (0.48, 6.37)	0.7134
			T/T	10 (83.3%)/2 (16.7%)	1.05 (0.13, 6.38)	
			G/G	24 (85.7%)/4 (14.3%)	Ref.	
EGF	rs2074390	Co-dominant	G/A	33 (75.0%)/11 (25.0%)	2.00 (0.60, 7.91)	0.5082
			A/A	10 (83.3%)/2 (16.7%)	1.20 (0.15, 7.25)	
			G/G	28 (80.0%)/7 (20.0%)	Ref.	
EGF	rs6850557	Co-dominant	G/A	31 (77.5%)/9 (22.5%)	1.16 (0.38, 3.64)	0.7193
			A/A	8 (88.9%)/1 (11.1%)	0.50 (0.02, 3.45)	
			C/C	18 (64.3%)/10 (35.7%)	Ref.	
AREG	rs11942466	Co-dominant	C/A	29 (80.6%)/7 (19.4%)	0.43 (0.14, 1.33)	0.0018
			A/A	20 (100.0%)/0 (0.0%)	0.00 (NA)	
			A/A	23 (82.1%)/5 (17.9%)	Ref.	
AREG	rs28635876	Co-dominant	A/G	28 (73.7%)/10 (26.3%)	1.64 (0.51, 5.91)	0.3709
			G/G	16 (88.9%)/2 (11.1%)	0.58 (0.08, 3.04)	
			A/A	23 (82.1%)/5 (17.9%)	Ref.	
AREG	rs13104811	Co-dominant	A/A	27 (79.4%)/7 (20.6%)	1.19 (0.34, 4.51)	0.9112
			G/G	17 (77.3%)/5 (22.7%)	1.35 (0.33, 5.60)	
			A/A	25 (80.6%)/6 (19.4%)	Ref.	
AREG	rs1353295	Co-dominant	A/G	35 (79.5%)/9 (20.5%)	1.07 (0.34, 3.56)	0.9812
			G/G	7 (77.8%)/2 (22.2%)	1.19 (0.15, 6.64)	
			A/A	28 (84.8%)/5 (15.2%)	Ref.	
AREG	rs3913032	Co-dominant	A/A	26 (74.3%)/9 (25.7%)	1.94 (0.59, 7.02)	0.5483
			C/C	13 (81.2%)/3 (18.8%)	1.29 (0.24, 6.12)	
			C/C	29 (82.9%)/6 (17.1%)	Ref.	
AREG	rs6447003	Co-dominant	C/G	31 (77.5%)/9 (22.5%)	1.40 (0.45, 4.65)	0.8347
			G/G	7 (77.8%)/2 (22.2%)	1.38 (0.18, 7.66)	
			A/A	38 (86.4%)/6 (13.6%)	Ref.	
AREG	rs10034692	Dominant	A/G-G/G	29 (72.5%)/11 (27.5%)	2.40 (0.82, 7.69)	0.1128
			G/G	48 (78.7%)/13 (21.3%)	Ref.	
			G/A-A/A	19 (82.6%)/4 (17.4%)	0.78 (0.20, 2.52)	
AREG	rs11725706	Dominant	A/A	44 (80.0%)/11 (20.0%)	Ref.	0.6866
			A/T-T/T	23 (79.3%)/6 (20.7%)	1.04 (0.32, 3.12)	
			T/T	42 (76.4%)/13 (23.6%)	Ref.	
AREG	rs2132065	Dominant	T/C-C/C	25 (86.2%)/4 (13.8%)	0.52 (0.13, 1.65)	0.2740
			C/C	42 (75.0%)/14 (25.0%)	Ref.	
			C/T-T/T	25 (89.3%)/3 (10.7%)	0.36 (0.08, 1.24)	
AREG	rs1017733	Dominant	T/T	25 (69.4%)/11 (30.6%)	Ref.	0.1089
			T/C	31 (83.8%)/6 (16.2%)	0.44 (0.13, 1.32)	
			C/C	11 (100.0%)/0 (0.0%)	0.00 (NA)	
ERCC1	rs11615	Co-dominant	G/G	34 (70.8%)/14 (29.2%)	0.24 (0.05, 0.73)	0.0235
			G/T	28 (90.3%)/3 (9.7%)	Ref.	
			T/T	5 (100.0%)/0 (0.0%)	0.00 (NA)	
ERCC1	rs3212986	Additive	A/A	30 (76.9%)/9 (23.1%)	Ref.	0.0096
			A/C	30 (81.1%)/7 (18.9%)	0.78 (0.25, 2.36)	
			C/C	7 (87.5%)/1 (12.5%)	0.48 (0.02, 3.22)	
XPD	rs13181	Co-dominant	3/3	24 (85.7%)/4 (14.3%)	Ref.	0.7552
			3/2	26 (70.3%)/11 (29.7%)	2.54 (0.75, 10.15)	
			2/2	17 (89.5%)/2 (10.5%)	0.71 (0.09, 4.06)	
TS	TS VNTR	Co-dominant	Low	39 (81.2%)/9 (18.8%)	Ref.	0.1472
			High	28 (77.8%)/8 (22.2%)	1.24 (0.42, 3.63)	
			TS expression alleles			

Abbreviations: AREG, amphiregulin; CI, confidence interval; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERCC1, excision repair cross-complementing 1; EREG, epi-regulin; LRT, likelihood ratio test; NA, not analyzed; OR, odds ratio; TRG, tumor regression grade; TS, thymidylate synthase; XPD, xeroderma pigmentosum D. Note: when possible (at least five patients per group), the co-dominant model data are shown.

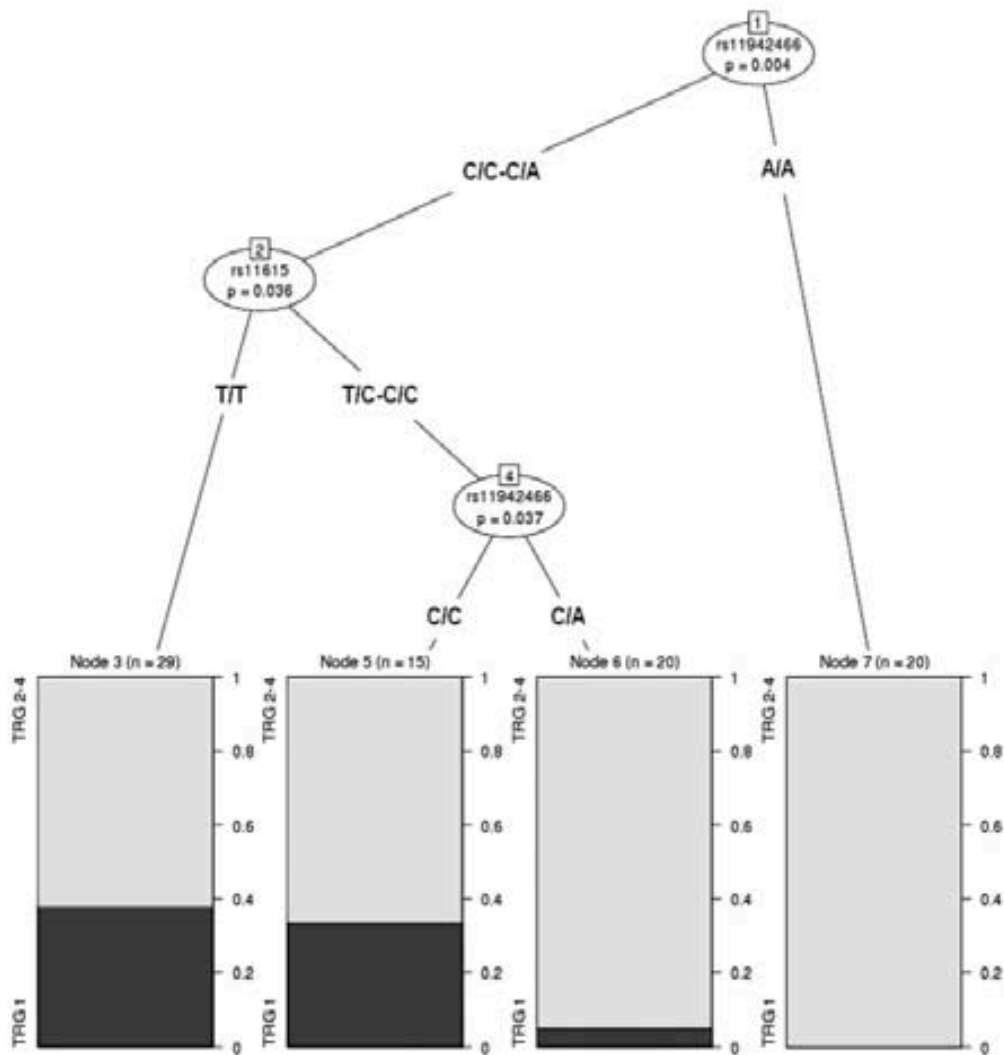


Figure 1. Conditional inference classification tree for pathological response. TRG, tumor regression grade.

In the multivariate analysis, two of these polymorphisms retained their significance. The rs11942466 in the *AREG* gene region showed an OR of 0.26 (95% CI: 0.06–0.79; $P=0.0149$) in the additive model. The rs11615 in the *ERCC1* gene remained significant in the recessive model and the OR was not estimable as no patients with the C/C genotype presented a complete response ($P=0.0238$).

To further explore the inter-relation of the effects found, a model was fitted using a stepwise forward automatic selection algorithm and combining SNPs showing a P -value <0.25 in the multivariate models, using the Akaike's Information Criteria for model selection. Of these, only the rs11942466 (OR: 0.26, 95% CI: 0.06–0.79; $P=0.0149$) and the rs11615 (OR not estimable; $P=0.0238$) polymorphisms were kept in the final model according to the astringent criteria used (LRT $P < 0.05$). To analyze potential interactions between the analyzed loci, a conditional inference classification tree was built using the SNPs that retained association in the adjusted models, rs11942466 C>A and rs11615 C>T. Four terminal nodes arose from the resulting tree, which showed significantly different rates of pathological response (Figure 1). The initial split was due to *AREG* rs11942466 C>A, indicating that this SNP is the main contributing factor to variation in the ypCR rate in our cohort of patients. The homozygous variant

at this locus defined a terminal node in which none of the patients achieved a ypCR. The patients with a C/C or C/A genotypes for rs11942466 C>A plus a T/T genotype for rs11615 C>T defined the node with the higher ypCR rate (37.9%). Finally, patients with a T/C or C/C genotypes for the rs11615 C>T were stratified into two nodes, depending on their genotype for the rs11942466 C>A SNP. Those who harbored an rs11942466 C/C genotype had a higher ypCR rate (33.3%) than those who harbored an rs11942466 C/A genotype (5%). To take the multiple contrasts being evaluated into account, a Monte-Carlo resample procedure was performed for each split creation.

DISCUSSION

In the present work, we found that one genetic variant in the *AREG* gene region and two in the *ERCC1* gene were associated with a ypCR after neoadjuvant capecitabine-based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. The rs11942466 C>A in *AREG* gene region and the rs11615 C>T in *ERCC1* gene retained their statistical association when adjusted for the relevant clinical variables. These SNPs also showed independent effects when tested in the same model. Furthermore, these polymorphisms were able to stratify patients according to their probability of achieving ypCR

when their interaction was evaluated in a classification tree. To our knowledge, this is the first pharmacogenetic study designed to evaluate the EGFR ligands as potential markers of response in rectal cancer patients treated exclusively with capecitabine plus radiotherapy.

Preoperative chemoradiotherapy has been adopted as the standard treatment for locally advanced rectal cancer. In this setting, fluoropyrimidines such as capecitabine act as radiosensitizers to increase the DNA damage produced by radiation. DNA-damage repair is intimately linked to EGFR signaling, both mechanisms acting against the radio-induced cellular damage.²³ In preclinical models, it has been shown that EGFR is activated by ionizing radiation and that EGFR levels correlate inversely with radiosensitivity of tumor cells.^{24,25} A recent study reported that EGFR status and EGF ligand expression influence treatment response in head and neck cancer cell lines.²⁶ In the clinical setting, the expression of EGFR ligands, AREG and EREG, has been correlated with outcome in metastatic colorectal cancer patients, suggesting their causal role in the pathway activation.²⁷

To our knowledge, the potential pharmacogenetic role of SNPs located in the AREG and EREG genes as biomarkers of response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer has not been explored previously. In this work, we found that the rs11942466 C>A polymorphism in the AREG gene region was associated with the ypCR. In a recent work, this intergenic SNP located between two linked genes (AREG and AREGB) was found to correlate with outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with irinotecan plus anti-EGFR.²⁸ The mechanism underlying this association has not yet been defined. One explanation could be that this SNP is in linkage disequilibrium with other functional genetic variants within the AREG gene. However, the lack of data regarding the minor allele frequency of variations within the AREG gene hinders confirmation of this hypothesis. Another potential explanation for the association between rs11942466 C>A and the ypCR in our study could come from data from the ENCODE project.²⁹ Findings from this project revealed the presence of multiple regulatory sites located both close to and far from the gene. The association of this intergenic SNP with response in our set of patients could be attributed to some functional role of this non-coding DNA region.

Our results differed from those in the literature regarding the polymorphisms involved in the DNA repair mechanism in rectal cancer patients treated with preoperative CRT based on fluoropyrimidines. Other groups that evaluated SNPs located in the ERCC1 gene as markers of response to CRT in rectal cancer found negative results.^{7,9} In our study, which included only patients treated with capecitabine, we found a significant association between ERCC1 rs11615 C>T and a complete pathological response. These findings could be attributed to radiosensitization differences between capecitabine and 5-FU, as previous reports in human cancer xenograft models have shown DNA damage is higher when radiotherapy is combined with capecitabine than with 5-FU. This difference is considered the result of activation of thymidine phosphorylate by capecitabine.³⁰

A ypCR after chemoradiotherapy is a good outcome predictor, and despite its limitations, it is now the primary end point as a surrogate factor in many clinical trials. Patients who achieve ypCR have a better outcome, but unfortunately, no biomarkers helping predict ypCR have been found to date. However, in this work the conditional inference classification tree clearly stratifies the probability of achieving ypCR according to the rs11942466 C>A and rs11615 C>T genotypes, reinforcing their role as potential biomarkers of ypCR. The limited number of patients included and the low number of recurrences in this series as well as the short follow-up do not allow testing the correlation of these SNPs with survival outcomes. In conclusion, the promising results of the present study should be considered as hypothesis generating until its validation in an independent cohort of patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (FIS/1101711, CM11/00102 to Ana Sebio). We thank Carolyn Newey for language editing.

REFERENCES

- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 1731–1740.
- Belluco C, De Paoli A, Canzonieri V, Sigon R, Fornasari M, Buonadonna A et al. Long-term outcome of patients with complete pathologic response after neoadjuvant chemoradiation for cT3 rectal cancer: implications for local excision surgical strategies. *Ann Surg Oncol* 2011; **18**: 3686–3693.
- Hofheinz RD, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, Hartmann JT et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 579–588.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 330–338.
- Mandola MV, Stoecklacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003; **63**: 2898–2904.
- Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999; **19**: 3249–3252.
- Lamas MJ, Duran G, Gomez A, Balboa E, Anido U, Bernardez B et al. X-ray cross-complementing group 1 and thymidylate synthase polymorphisms might predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; **82**: 138–144.
- Villafraña E, Okuzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 1779–1786.
- Paez D, Salazar J, Pare L, Pertriz L, Targarona E, del Rio E et al. Pharmacogenetic study in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy: polymorphisms in thymidylate synthase, epidermal growth factor receptor, GSTP1, and DNA repair genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; **81**: 1319–1327.
- Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2884–2890.
- Clancy C, Burke JP, Coffey JC. KRAS mutation does not predict the efficacy of neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol* 2013; **22**: 105–111.
- Liu W, Innocenti F, Wu MH, Desai AA, Dolan ME, Cook Jr. EH et al. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* 2005; **65**: 46–53.
- Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, Jakobsen A. Germ-line polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2007; **50**: 1363–1369.
- Morial T, Kobrin MS, Hope C, Speck L, Korc M. A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10217–10221.
- Hsieh YY, Tzeng CH, Chen MH, Chen PM, Wang WS. Epidermal growth factor receptor RS21K polymorphism shows favorable outcomes in KRAS wild-type colorectal cancer patients treated with cetuximab-based chemotherapy. *Cancer Sci* 2012; **103**: 791–796.
- Hu-Lieskovan S, Vallbohmer D, Zhang W, Yang D, Pohl A, Labonte MJ et al. EGF61 polymorphism predicts complete pathologic response to cetuximab-based chemoradiation independent of KRAS status in locally advanced rectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 5161–5169.
- Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, Fakhoury H, Fryer AA, Strange RC et al. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet* 2002; **359**: 397–401.
- Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994; **73**: 2680–2686.
- Gregory Warnes, with contributions from Gregor Gorjanc, Friedrich Leisch and Michael Man. *Population Genetics* 2012.

- 20 Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr* 1974; **AC 19**: 716–723.
- 21 Dudbridge F, Koeleman BP. Rank truncated product of P-values, with application to genomewide association scans. *Genet Epidemiol* 2003; **25**: 360–366.
- 22 Hothorn T, Hornik K, Zeileis A. Unbiased recursive partitioning: a conditional inference framework. *J Comput Graph Stat* 2006; **13**: 651–674.
- 23 Kriegs M, Kasten-Pisula U, Rieckmann T, Holst K, Saker J, Dahm-Daphl J *et al*. The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)* 2010; **9**: 889–897.
- 24 Dent P, Reardon DB, Park JS, Bowers G, Logsdon C, Valerie K *et al*. Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 2493–2506.
- 25 Contessa JN, Hampton J, Lammering G, Mikkelsen RB, Dent P, Valerie K *et al*. Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene* 2002; **21**: 4032–4041.
- 26 Jedlinski A, Ansell A, Johansson AC, Roberg K. EGFR status and EGFR ligand expression influence the treatment response of head and neck cancer cell lines. *J Oral Pathol Med* 2013; **42**: 26–36.
- 27 Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J *et al*. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumours predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5068–5074.
- 28 Sebio A, Paez D, Salazar J, Berenguer-Llergo A, Pare-Brunet L, Lasa A *et al*. Intergenic polymorphisms in the amphiregulin gene region as biomarkers in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR plus irinotecan. *Pharmacogenomics J* 2013; **14**: 256–262.
- 29 The ENCODE project consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012; **489**: 57–74.
- 30 Sawada N, Ishikawa T, Sekiguchi F, Tanaka Y, Ishitsuka H. X-ray irradiation induces thymidine phosphorylase and enhances the efficacy of capecitabine (Xeloda) in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2948–2953.
- 31 Chen P, Wiencke J, Aldape K, Kesler-Diaz A, Milke R, Kelsey K *et al*. Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; **9**: 843–847.
- 32 Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD *et al*. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 965–971.
- 33 Rzeszowska-Wolny J, Polanska J, Pietrowska M, Palyvoda O, Jaworska J, Butkiewicz D *et al*. Influence of polymorphisms in DNA repair genes XPD, XRCC1 and MGMT on DNA damage induced by gamma radiation and its repair in lymphocytes in vitro. *Radiat Res* 2005; **164**: 132–140.
- 34 Cometta T, Festa F, Testa A, Cozzi R. DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; **66**: 537–545.

4.- DISCUSIÓN

4.1.- Estudios farmacogenéticos en la vía del factor de crecimiento epidérmico en cáncer colorrectal metastásico.

En los últimos años la supervivencia de los pacientes con CCRm se ha incrementado de forma muy significativa. Esto se ha debido, en parte, a las mejoras en la cirugía de resección de lesiones metastásicas, sobre todo en pacientes con enfermedad exclusivamente hepática, y también a la aparición de nuevos fármacos diana dirigidos contra cascadas de señalización específicas.

Un grupo muy importante de estos fármacos son los diseñados contra la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico para los existen biomarcadores de eficacia. Desde el primer estudio, en el año 2006, en el que se describió por primera vez que los pacientes con mutaciones en el exón 2 del gen KRAS no respondían a los tratamientos anti-EGFR [164], numerosos estudios han confirmado a la mutación de KRAS (exon 2) como el primer biomarcador predictivo en cáncer colorrectal metastásico.

Sin embargo, a pesar de la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* como marcadores de no respuesta a terapias anti-EGFR, un elevado porcentaje (30-40%) de pacientes con KRAS nativo, no responde a dichos fármacos. Esto indica que, además de estas mutaciones, existen otros factores que influyen en la respuesta a estas terapias biológicas.

El polimorfismo localizado en el sitio de unión del microRNA let-7 a la región 3'UTR del gen que codifica para *KRAS* se consideró como uno de estos factores por dos autores distintos. En el trabajo de Graciano *et al.*, que incluía

Discusión

63 pacientes con KRAS y BRAF nativos tratados en segunda y posteriores líneas con anti-EGFR e irinotecan, los pacientes con el genotipo con al menos un alelo G del KRAS LCS6 presentaban una peor SLP, una peor SG y un menor ratio de control de la enfermedad, que los pacientes con el genotipo T/T [203]. En el segundo estudio, publicado por Zhang *et al.*, unos meses después, y que investigó pacientes con KRAS nativo tratados con cetuximab en monoterapia, el alelo G se asoció a una mejor respuesta y a una tendencia hacia una mejor SLP y SG [204]. En posteriores comunicaciones, los autores de estos trabajos sugirieron que las diferencias en el tratamiento con o sin quimioterapia entre estas poblaciones podría explicar las diferencias en los resultados obtenidos [221, 222].

En el primer trabajo de esta tesis doctoral, se plantea el estudio de esta variante genética y se evalúa su valor como biomarcador de respuesta a un tratamiento basado en anti-EGFR en pacientes con CCRm. En este trabajo, los pacientes con al menos una variante G del polimorfismo KRAS LCS6 no presentaron respuesta al tratamiento con irinotecan y anti-EGFR, mientras que el 31.9% de los pacientes con el genotipo nativo T/T respondieron. En el global de los pacientes del estudio esta mayor respuesta no se tradujo en un aumento de la SLP, sin embargo, en un subanálisis realizado en los pacientes tratados en segunda línea, se observó una clara tendencia hacia una mayor SLP para los pacientes con el genotipo nativo T/T.

En este mismo trabajo, evaluamos la relación de esta variante genética con la respuesta y la supervivencia en una cohorte independiente de pacientes

tratados exclusivamente con quimioterapia en primera línea. En esta serie no se encontró ninguna relación entre el polimorfismo KRAS LSC6 y la respuesta, por lo que concluimos que este SNP carece de valor como biomarcador en pacientes no tratados con anti-EGFR.

En un estudio muy reciente, los pacientes con el genotipo nativo para el polimorfismo KRAS LSC6, presentaron una mayor SLP y SG cuando eran tratados con quimioterapia + anti-EGFR frente a anti-EGFR en monoterapia. Sin embargo, en este estudio los pacientes que recibieron tratamiento en monoterapia con cetuximab presentaban mejor supervivencia si tenían un genotipo con al menos un alelo variante G [205].

Se ha postulado que el miRNA let-7 regula la expresión del gen *KRAS* mediante su unión en la región 3'UTR [223]. Sin embargo, un estudio reciente en el que se realiza "knock-in" de la variante G del polimorfismo en una línea celular de cáncer de colon (SW48) con KRAS LSC6 nativo, cuestiona aquel postulado [224]. Los autores reportan que este polimorfismo no modula los valores de proteína KRAS, ni su activación o su señalización a través de PI3K o MAPK. Demuestran, sin embargo, un aumento de la proliferación celular y una disminución en los niveles de microRNA let-7a, let-7b y let-7c en las células transfectadas con la variante G. Estos resultados sugieren que la actividad biológica del polimorfismo en cuestión, se ejerce a través de la regulación de la expresión del microRNA let-7, y no a través de la modulación transcripcional del gen *KRAS*.

Para poder establecer de forma definitiva el papel como marcador farmacogenético de la variante genética KRAS LSC6, es imprescindible

Discusión

incluir este SNP en futuros ensayos clínicos diseñados con carácter prospectivo.

En el segundo trabajo de esta tesis doctoral se evaluaron polimorfismos en el gen *EGFR* y sus ligandos (anfiregulina y epiregulina) como factores predictivos de control de la enfermedad en pacientes con CCRm refractario y tratados con anti-EGFR.

Hasta la fecha de publicación de este trabajo, los estudios llevados a cabo en relación al potencial factor predictivo y/o pronóstico de estos ligandos habían sido únicamente estudios de expresión. En estos estudios una mayor expresión (niveles de mRNA) de ambos ligandos se asoció a una mejor respuesta. En el primero de ellos publicado por Khambata-Ford *et al.* los autores describieron una asociación entre la alta expresión de AREG y EREG y un mayor control de la enfermedad en 110 pacientes tratados con cetuximab en monoterapia. Estos pacientes con alta expresión de AREG y EREG también presentaban una mayor SLP [175]. En un estudio posterior Jacobs *et al.* confirmaron estos resultados al evaluar a 220 pacientes con CCRm tratados con cetuximab e irinotecan en segunda línea o posteriores. En los pacientes de esta serie con KRAS nativo, la alta expresión de AREG y EREG se asoció a una mayor respuesta y también a una mayor SLP y SG. Por el contrario, en los pacientes con mutación de KRAS no se observó dicha asociación [174].

Los primeros estudios farmacogenéticos de los ligandos del EGFR anfiregulina (AREG) y epiregulina (EREG) son el motivo de la segunda

publicación incluida en la presente tesis. En este estudio, se seleccionaron Tag-SNPs para los genes AREG, EREG y EGF y se analizaron los SNPs funcionales descritos en EGFR y EGF. Para identificar los Tag-SNPs se utilizó la base de datos HapMap (versión 27- B36) y el software Haploview (versión 4.2) con los siguientes criterios: frecuencia del alelo menos frecuente (FAM) superior al 10% y r^2 de 0.8 para el desequilibrio de ligamiento. En el momento de la selección de los SNPs, en la base de datos HapMap no existía ningún polimorfismo en el gen de la AREG con FAM >10%, por lo que los Tag-SNPs seleccionados se encuentran todos en una localización intergénica entre el gen *AREG* y el gen de la anfiregulina B (*AREGB*) (Figura 14). El gen *AREGB*, es un parálogo que resulta de una duplicación del gen AREG. La función de *AREGB* no ha sido descrita y son pocos los datos que existen sobre este gen.

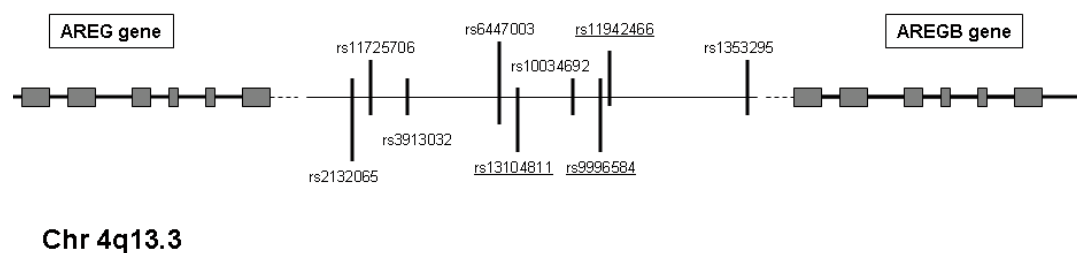


Figure 13. Región intergénica entre el gen AREG y el gen AREGB donde se localizan los polimorfismos seleccionados.

Discusión

Nuestros resultados muestran que tres polimorfismos (rs11942466 C>A, rs13104811 A>G and rs9996584 C>T) con localización intergénica entre el gen *AREG* y el gen *AREGB* se asociaron con el control de enfermedad en pacientes KRAS y BRAF nativo con CCRm refractario y tratados con anti-EGFR (panitumumab o cetuximab) e irinotecan/FOLFIRI. El polimorfismo rs11942466 C>A se correlacionó además con la SLP y la SG y el rs9996584 C>T también se asoció con la SG. Para el polimorfismo *AREG* rs11942466 C>A, ninguno de los pacientes con el genotipo A/A presentó respuesta al tratamiento y además presentaron una corta SLP y SG.

La funcionalidad potencial de estos polimorfismos de localización intergénica todavía está por determinar. El proyecto ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) es un proyecto de investigación pública que nace con la intención de identificar todos los elementos funcionales del genoma humano. Los genes que codifican para proteínas suponen aproximadamente solo un 1.5% del genoma humano. El objetivo de este proyecto es la determinación del papel del resto de componentes del genoma al que tradicionalmente se había denominado “ADN basura”. En este ADN no codificante para proteínas se encuentran aproximadamente el 90% de los SNPs del genoma humano. Muchos de estos SNPs en regiones no codificantes se han asociado a diversas enfermedades, por lo que el conocimiento profundo de la funcionalidad de estas regiones es fundamental para determinar el verdadero valor de estas variaciones genéticas. Uno de los hallazgos más relevantes del proyecto ENCODE es que el 80% del genoma presenta elementos

ligados a funciones bioquímicas y que el espacio entre los genes está relleno con elementos regulatorios del ADN, regiones promotoras y numerosas regiones que codifican transcritos de ARN que no se traducen a proteínas, pero que pueden tener relevancia en la regulación génica [225].

Para explorar la funcionalidad de los polimorfismos asociados con la respuesta y la supervivencia en nuestra población, se utilizó la base de datos RegulomeDB (www.Regulomedb.org) en la que se encuentran los datos generados por el proyecto ENCODE y la base de datos F-SNP. Esta última, contiene la información obtenida de un gran número de bases de datos y herramientas bioinformáticas sobre los potenciales efectos funcionales de los SNPs. Para los tres polimorfismos intergénicos, este estudio *in silico* mostró una funcionalidad potencial por alteración de la regulación de mecanismos de la transcripción.

En el segundo trabajo de esta tesis se reporta también, una asociación entre el polimorfismo rs712829 G>T localizado en el gen EGFR con la SLP y la SG. Diversos trabajos han evaluado el papel de cuatro polimorfismos funcionales en el gen del EGFR (EGFR CA repeticiones en el intrón 1, EGFR Arg521Lys, EGFR -216G>T y EGFR -191C>A) y un polimorfismo funcional descrito en su ligando natural, el EGF (EGF A61G). En un estudio pionero, Graziano y colaboradores realizaron un perfil farmacogenético en 110 pacientes tratados con cetuximab e irinotecan reportando que el polimorfismo consistente en repeticiones CA en el intrón 1 del EGFR y el EGF A61G se relacionaban con la supervivencia global. Sin embargo, el polimorfismo rs712829 G>T no se correlacionó con la supervivencia [185]. Dahan et al. estudiaron varios

Discusión

polimorfismos localizados en genes implicados en la cascada de señalización del EGFR. En un subgrupo de 34 pacientes con KRAS nativo tratados con irinotecan y cetuximab, el EGFR rs712830 C>A, aunque no el EGFR rs712829 G>T, se asoció con el tiempo a la progresión únicamente en el análisis univariado.

El segundo artículo de esta tesis es, por lo tanto, el único en el que se ha descrito una asociación del EGFR rs712829 polimorfismo con la supervivencia de los pacientes con KRAS nativo tratados con irinotecan y cetuximab. En el estudio realizado por Graziano y colaboradores, pese a reunir 110 pacientes, el análisis de las mutaciones de KRAS no fue evaluado. En el estudio de Dahan y colaboradores se realizó un análisis en el subgrupo de pacientes con tumores KRAS nativo, pero el número de pacientes con esta característica era probablemente insuficiente para encontrar diferencias estadísticamente significativas. Para validar la función de este polimorfismo como biomarcador de eficacia en pacientes tratados con terapias anti-EGFR, es necesario el análisis de una cohorte de pacientes amplia y de características clínicas y moleculares homogénea.

4.2.- Estudios farmacogenéticos en la vía del factor de crecimiento epidérmico, en los genes reparadores del ADN y en el gen de la timidilato sintetasa en cáncer de recto localmente avanzado

En la actualidad el tratamiento inicial en el cáncer de recto localmente avanzado consiste en la quimiorradioterapia preoperatoria. Este tratamiento ha demostrado mejorar la tasa de recidivas locales y la preservación del esfínter [109, 112]. Además, la obtención de una respuesta completa patológica tras la quimiorradioterapia (ypCR) y el grado de regresión patológica se han asociado a un mejor pronóstico [61, 114, 226].

En la actualidad los quimioterápicos de elección para la quimiorradioterapia son las fluorouropirimidinas, 5-Fu o capecitabina. Hasta la fecha, la adición un segundo quimioterápico no se considera un estándar de tratamiento. Pese a que en un estudio reciente se demostró una mayor SLP con la adición de oxaliplatino al 5-Fu, otro estudio paralelo en el tiempo no demostró diferencias con la combinación de oxaliplatino y capecitabina [122, 227]. Además, la supervivencia a 3 años en el estudio que empleó la capecitabina en monoterapia con radioterapia fue del 74.5%, muy similar a la demostrada por el estudio que empleó 5-Fu en combinación con oxaliplatino (75.9%).

La capecitabina es el fármaco de elección en muchos centros para el tratamiento combinado con radioterapia en el cáncer de recto localmente avanzado. Un estudio randomizado comparó capecitabina frente a 5-Fu

Discusión

administrado de forma concomitante a la radioterapia, y demostró la no inferioridad de la capecitabina frente al 5-Fu ya que la supervivencia a 5 años fue del 76% en la rama de capecitabina comparado con el 67% en la de 5-Fu [228].

El papel fundamental de la capecitabina en la quimiorradioterapia preoperatoria es fundamentalmente como radiosensibilizante. Se ha sugerido en modelos xenográficos que la capecitabina podría tener una mayor capacidad radiosensibilizante que el 5-Fu [116].

Existen varios mecanismos de radiorresistencia a las radiaciones ionizantes y entre ellos se encuentra la señalización a través de la vía del EGFR. Estudios *in vivo* con carcinomas murinos han demostrado que existe una correlación inversa entre la señalización a través de EGFR y la radiosensibilidad. La transferencia del gen EGFR a células tumorales con baja expresión de EGFR y radiosensibles demostró la aparición de radioresistencia celular [229, 230]. Este hecho, que llevó a la evaluación de tratamientos anti-EGFR en combinación con radioterapia, pero en la actualidad esta combinación se considera un tratamiento experimental.

Las mutaciones en la cascada de señalización del EGFR han sido también evaluadas como factores predictivos de respuesta a la quimiorradioterapia en cáncer de recto localmente avanzado. Sin embargo, un reciente metaanálisis ha demostrado que las mutaciones de KRAS no afectan a la respuesta al tratamiento neoadyuvante y no se relacionan con la supervivencia cáncer-específica [231]. Otras variantes genéticas han sido también estudiadas en pacientes tratados con la combinación de quimioterapia y radioterapia

preoperatorias. Los polimorfismos en el gen EGFR y su ligando EGF han sido estudiados como biomarcadores de respuesta en cáncer de recto localmente avanzado tratado con quimiorradioterapia. Sin embargo, en este contexto, sólo Spindler *et al.* describieron una mayor respuesta al tratamiento para los pacientes con el genotipo G/G del polimorfismo -216 G>T (rs712829 G>T) tras el tratamiento con quimiorradioterapia basada en la fluorouracilina tegafur-uracil [191]. Otros grupos han estudiado alguno de estos polimorfismos en los genes EGFR y EGF en un contexto similar sin describir asociaciones [216, 232]. Los polimorfismos en los genes AREG y EREG no habían sido estudiados como factores predictivos de respuesta a quimiorradioterapia.

El tercer trabajo de la presente tesis evaluó SNPs en los genes *EGFR*, *EGF* y los ligandos *AREG* y *EREG* como biomarcadores de respuesta completa patológica tras el tratamiento con quimiorradioterapia basada en capecitina. Este trabajo incluyó también la evaluación de polimorfismos localizados en los genes reparadores del ADN y la TS. Varios estudios previos habían evaluado el valor de SNPs en estos genes como potenciales marcadores de respuesta tras tratamiento neoadyuvante con quimiorradioterapia. En estos trabajos, los quimioterápicos empleados incluían mayoritariamente 5-Fu +/- oxaliplatino y han sido descritos en el apartado 1.3.2.

Los resultados de este tercer estudio mostraron, al igual que en el segundo trabajo de esta tesis, una asociación del polimorfismo AREG rs11942466 C>A con la respuesta: el 35.7% de los pacientes con el genotipo C/C

Discusión

presentaron una ypCR comparado con el 19.4% de los pacientes con un genotipo C/A y ninguno de los pacientes con un genotipo A/A.

Como ha sido discutido en referencia al segundo artículo de la tesis, este polimorfismo se encuentra localizado a nivel intergénico por lo que su funcionalidad no ha sido definitivamente establecida. Estudios *in silico* demuestran una potencial funcionalidad por alteración de la regulación de la transcripción. El hecho de que en dos poblaciones de pacientes diferentes (CCRm tratado con anti-EGFR y cáncer de recto locamente avanzado tratado con quimiorradioterapia), el genotipo A/A de este polimorfismo se asocie con una peor respuesta y supervivencia, apoya el valor de este genotipo como un factor de no respuesta y de mal pronóstico en ambas poblaciones.

En este tercer estudio, un polimorfismo funcional localizado en el promotor del gen reparador del ADN ERCC1, rs11615 T>C, también se asoció con la probabilidad de presentar un ypCR tras el tratamiento con quimiorradioterapia neoadyuvante.

En los estudios previos que evaluaron este SNP no se reportó una asociación del genotipo con la respuesta. Este hecho puede deberse, en parte, a la falta de homogeneidad entre diferentes esquemas de quimioterapia que acompañaban a la radioterapia en los distintos estudios realizados.

Para profundizar en la relación de estos polimorfismos entre ellos y con la ypCR, se realizó un análisis de inferencia condicional. El árbol de respuesta obtenido de este análisis, clasifica a los pacientes según las probabilidades de alcanzar una ypCR en 4 grupos. El grupo de pacientes con mayor

probabilidad de respuesta completa (casi un 40%) comprendía los pacientes con genotipos C/C o C/A para el rs11942466 y T/T para el rs11615, en comparación con un 0% para los pacientes con el genotipo A/A para el rs11942466 (Figura 14).

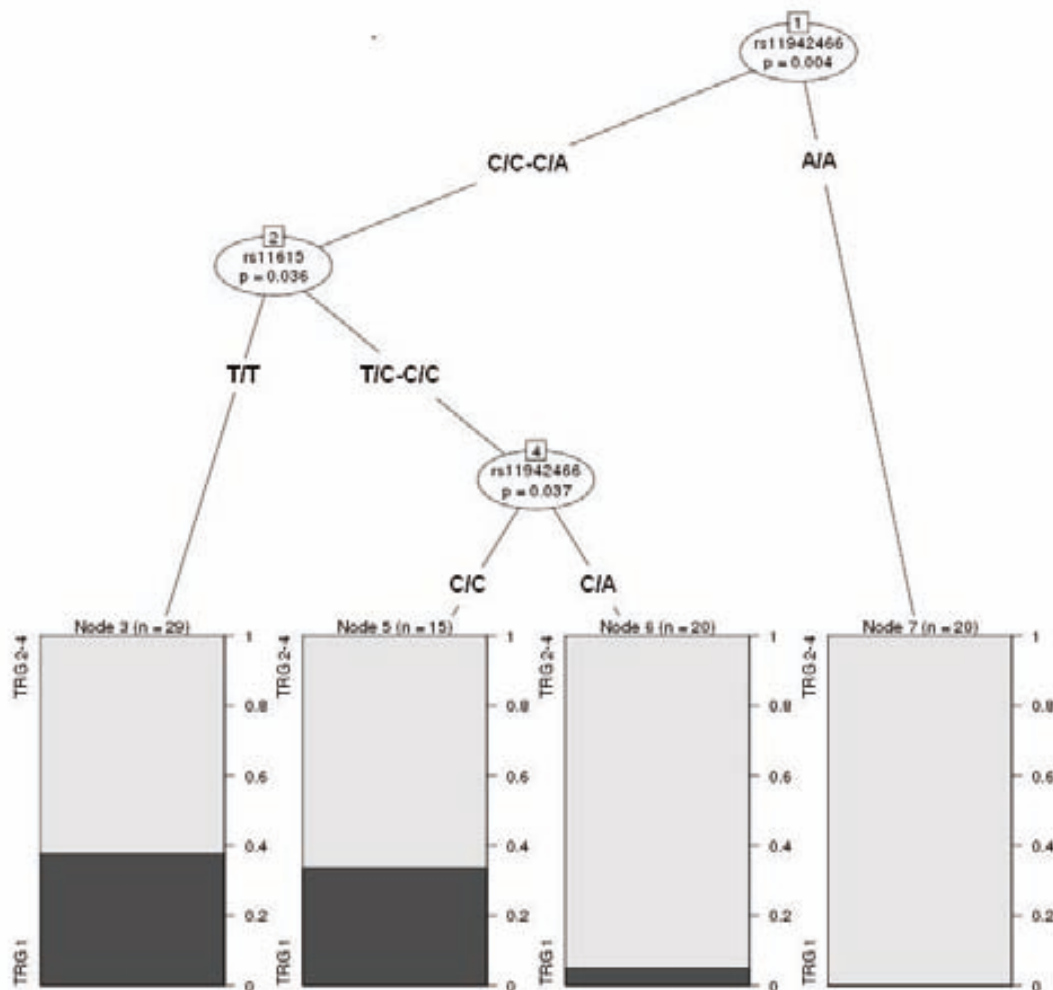


Figura 14. Árbol de clasificación de la probabilidad de respuesta completa patológica.

Discusión

Esta clasificación, que deriva únicamente del estudio de 2 polimorfismos, podría ser de gran utilidad como biomarcador para los pacientes con cáncer de recto localmente avanzado con indicación de quimiorradioterapia basada en capecitabina.

5.- CONCLUSIONES

5'.- CONCLUSIONS

En relación a la evaluación de las variantes genéticas en la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico como marcadores farmacogenéticos de respuesta y/o supervivencia en cáncer colorrectal metastásico tratados con terapias anti-EGFR, las conclusiones son las siguientes:

1. El polimorfismo KRAS LCS6 se asocia con la respuesta en pacientes refractarios tratados con irinotecan y terapias anti-EGFR.
2. El polimorfismo KRAS LCS6 no influencia la respuesta al tratamiento en pacientes tratados exclusivamente con quimioterapia.
3. El polimorfismo rs11942466 C>A, localizado en la región génica de la AREG, se asocia con el ratio de control de la enfermedad, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en esta población.
4. Los polimorfismos rs9996584 C>T y rs13104811 A>G, localizados en la región génica de la AREG, se asocian con el ratio de control de la enfermedad. El polimorfismo rs9996584 C>T también se correlaciona con la supervivencia global en esta población.
5. El polimorfismo en el gen EGFR se asocia con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en esta población.

Conclusiones

En relación a la evaluación de las variantes genéticas en la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico, en los genes reparadores y en los genes implicados en el metabolismo de las fluorouropirimidinas, en pacientes cáncer de recto localmente avanzado tratado quimiorradioterapia preoperatoria, las conclusiones son las siguientes:

6. El polimorfismo rs11942466 C>A, localizado en la región génica de la AREG, se asocia con la respuesta completa patológica en esta población.
7. El polimorfismo rs11615 T>C en el gen *ERCC1* se asocia con la respuesta completa patológica en esta población.
8. El árbol de respuesta formado con los polimorfismos rs11942466 C>A y rs11615 T>C permite clasificar a los pacientes en alta probabilidad de respuesta ($\approx 40\%$) en contraposición a los pacientes sin probabilidad de responder.

Regarding the evaluation of the genetic variants in the EGFR pathway as pharmacogenetic markers of response and/or survival, in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR therapies, the conclusions are the following:

1. The KRAS LCS6 polymorphism is associated with the response in patients treated with salvage irinotecan plus anti-EGFR therapies.
2. The KRAS LCS6 polymorphism does not influence the response to treatment in patients treated exclusively with chemotherapy.
3. The rs11942466 C>A polymorphism in the *AREG* gene region is associated with the disease control rate, progression-free and overall survival in this population.
4. The rs9996584 C>T and rs13104811 A>G polymorphisms in the *AREG* gene region are associated with the disease control rate. The rs9996584 C>T also correlates with overall survival in this population.
5. The rs712829 G>T polymorphism in the gene is associated with progression-free and overall survival in this population.

Conclusions

Regarding the evaluation as pharmacogenetic markers of genes within EGFR pathway, DNA repair and fluoropyrimidine metabolism, in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy, the conclusions are the following:

6. The rs11942466 C>A polymorphism located in the *AREG* gene region is associated with a pathological complete response in this population.
7. The rs11615 T>C polymorphism in the *ERCC1* gene is associated with a pathological complete response in this population.
8. The response tree constructed with the rs11942466 C>A and rs11615 T>C polymorphisms allows to classify patients with a high probability of response ($\approx 40\%$) as opposed to patients with no probability of response

6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
2. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 2010;116:544-73.
3. Howlader N NA, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission. 2013.
4. DeVita V J, Hellman, S and Rosenberg, SA. . *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th Edition ed: Lippincott-Raven. 2008.
5. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-32.
6. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990;323:1664-72.
7. Wynder EL, Reddy BS. Metabolic epidemiology of colorectal cancer. *Cancer* 1974;34:suppl:801-6.
8. Alexander DD, Miller AJ, Cushing CA, et al. Processed meat and colorectal cancer: a quantitative review of prospective epidemiologic studies. *Eur J Cancer Prev* 2010;19:328-41.
9. Beresford SA, Johnson KC, Ritenbaugh C, et al. Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 2006;295:643-54.
10. Hall MN, Campos H, Li H, et al. Blood levels of long-chain polyunsaturated fatty acids, aspirin, and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:314-21.
11. MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA, et al. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA* 2006;295:403-15.

Referencias bibliográficas

12. Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, et al. Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case-control study. *Int J Epidemiol* 2003;32:200-9.
13. Aune D, Lau R, Chan DS, et al. Nonlinear reduction in risk for colorectal cancer by fruit and vegetable intake based on meta-analysis of prospective studies. *Gastroenterology* 2011;141:106-18.
14. Johnson IT, Lund EK. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:161-81.
15. Murphy N, Norat T, Ferrari P, et al. Consumption of dairy products and colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *PLoS One* 2013;8:e72715.
16. Reid ME, Duffield-Lillico AJ, Sunga A, et al. Selenium supplementation and colorectal adenomas: an analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *Int J Cancer* 2006;118:1777-81.
17. Friedenreich C, Norat T, Steindorf K, et al. Physical activity and risk of colon and rectal cancers: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2398-407.
18. MacInnis RJ, English DR, Hopper JL, et al. Body size and composition and colon cancer risk in women. *Int J Cancer* 2006;118:1496-500.
19. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2009;124:2406-15.
20. Moskal A, Norat T, Ferrari P, et al. Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer* 2007;120:664-71.
21. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;361:2449-60.
22. Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal* 2013;26:570-79.
23. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, et al. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:1130-4.

24. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487:330-7.
25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
26. Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology* 2010;56:167-79.
27. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
28. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:808-11.
29. Bae JM, Kim JH, Kang GH. Epigenetic alterations in colorectal cancer: the CpG island methylator phenotype. *Histol Histopathol* 2013;28:585-95.
30. Hammoud SS, Cairns BR, Jones DA. Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25:177-83.
31. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:988-93.
32. Hamilton SR, Nakamura S, Bosman F, et al. Carcinoma of the colon and rectum. Chapter 8 in WHO Classification of Tumours of the Digestive System. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2010:134-46.
33. Donehower LA, Creighton CJ, Schultz N, et al. MLH1-silenced and non-silenced subgroups of hypermutated colorectal carcinomas have distinct mutational landscapes. *J Pathol* 2013;229:99-110.
34. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:517-31.
35. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990;348:125-32.

Referencias bibliográficas

36. Rashid A, Zahurak M, Goodman SN, et al. Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gut* 1999;44:826-33.
37. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 1994;54:5523-6.
38. COSMIC. Catalog Of Somatic Mutations In Cancer. <http://cancersangeracuk>.
39. Niault TS, Baccharini M. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2010;31:1165-74.
40. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch* 2013;463:613-21.
41. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
42. M F, S R, SF T, et al. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012;3:153-73.
43. Segnan N, Armaroli P, Bonelli L, et al. Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: follow-up findings of the Italian Randomized Controlled Trial--SCORE. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1310-22.
44. Schoen RE, Pinsky PF, Weissfeld JL, et al. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N Engl J Med* 2012;366:2345-57.
45. Atkin WS, Edwards R, Kralj-Hans I, et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2010;375:1624-33.
46. Mandel JS, Church TR, Ederer F, et al. Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:434-7.
47. Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993;328:1365-71.
48. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, et al. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348:1472-7.

49. Nelson RS, Thorson AG. Colorectal cancer screening. *Curr Oncol Rep* 2009;11:482-9.
50. Sosna J, Morrin MM, Kruskal JB, et al. CT colonography of colorectal polyps: a metaanalysis. *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:1593-8.
51. Ahlquist DA. Molecular detection of colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2010;138:2127-39.
52. Berger BM, Ahlquist DA. Stool DNA screening for colorectal neoplasia: biological and technical basis for high detection rates. *Pathology* 2012;44:80-8.
53. Edge SBB DRC, C.C.; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. *AJCC Cancer Staging Manual* (ed 7th Edition). New York: Springer. 2010.
54. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1420-5.
55. Dukes C. The classification of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932;35:323-32.
56. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol* 2003;21:2912-9.
57. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, et al. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:433-41.
58. Nelson H, Petrelli N, Carlin A, et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:583-96.
59. Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* 1986;104:66-73.
60. Oussoultzoglou E, Rosso E, Fuchshuber P, et al. Perioperative carcinoembryonic antigen measurements to predict curability after liver resection for colorectal metastases: a prospective study. *Arch Surg* 2008;143:1150-8; discussion 58-9.
61. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2010;11:835-44.

Referencias bibliográficas

62. Capirci C, Valentini V, Cionini L, et al. Prognostic value of pathologic complete response after neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer: long-term analysis of 566 ypCR patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:99-107.
63. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73:2680-6.
64. Chang EY, Dorsey PB, Frankhouse J, et al. Combination of microsatellite instability and lymphocytic infiltrate as a prognostic indicator in colon cancer. *Arch Surg* 2009;144:511-5.
65. Kumar S, Chang EY, Frankhouse J, et al. Combination of microsatellite instability and lymphocytic infiltrate as a prognostic indicator for adjuvant therapy in colon cancer. *Arch Surg* 2009;144:835-40.
66. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339:223-8.
67. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609-18.
68. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
69. Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer* 2005;92:1746-53.
70. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003;63:1608-14.
71. Jen J, Kim H, Piantadosi S, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:213-21.
72. Bertagnolli MM, D. Niedzwiecki, M. Hall, et al. Presence of 18q loss of heterozygosity (LOH) and disease-free and overall survival in stage II colon cancer: CALGB Protocol 9581. *ASCO Meet Abst* 2009;27 (15S):4012.

73. Bertagnolli MM, Redston M, Compton CC, et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: prospective evaluation of biomarkers for stages II and III colon cancer--a study of CALGB 9581 and 89803. *J Clin Oncol* 2011;29:3153-62.
74. Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 2008;57:941-50.
75. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011;29:2011-9.
76. Yaeger R, Cercek A, Chou JF, et al. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2014.
77. Karagkounis G, Torbenson MS, Daniel HD, et al. Incidence and prognostic impact of KRAS and BRAF mutation in patients undergoing liver surgery for colorectal metastases. *Cancer* 2013;119:4137-44.
78. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005;23:7518-28.
79. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:1477-84.
80. Salazar R, Roepman P, Capella G, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:17-24.
81. Xu Y, Xu Q, Yang L, et al. Identification and validation of a blood-based 18-gene expression signature in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19:3039-49.

Referencias bibliográficas

82. Oh SC, Park YY, Park ES, et al. Prognostic gene expression signature associated with two molecularly distinct subtypes of colorectal cancer. *Gut* 2012;61:1291-8.
83. Dienstmann R, Guinney J, Delorenzi M, et al. Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes. *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (supple; abst 3511).
84. H E. *A History of Surgery*. London, England: Greenwich Medical Media Limited; pp.109-110. 2001.
85. Benson AB, 3rd. *Cancers of the Colon and Rectum. A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Management*. 2013;p. 129-35.
86. Ridgway PF, Darzi AW. The role of total mesorectal excision in the management of rectal cancer. *Cancer Control* 2003;10:205-11.
87. Lin HH, Lin JK, Lin CC, et al. Circumferential margin plays an independent impact on the outcome of rectal cancer patients receiving curative total mesorectal excision. *Am J Surg* 2013;206:771-7.
88. Fleshman J, Sargent DJ, Green E, et al. Laparoscopic colectomy for cancer is not inferior to open surgery based on 5-year data from the COST Study Group trial. *Ann Surg* 2007;246:655-62; discussion 62-4.
89. Jayne DG, Guillou PJ, Thorpe H, et al. Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group. *J Clin Oncol* 2007;25:3061-8.
90. Colon Cancer Laparoscopic or Open Resection Study G, Buunen M, Veldkamp R, et al. Survival after laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: long-term outcome of a randomised clinical trial. *Lancet Oncol* 2009;10:44-52.
91. Lacy AM, Delgado S, Castells A, et al. The long-term results of a randomized clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. *Ann Surg* 2008;248:1-7.
92. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990;322:352-8.

93. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med* 1995;122:321-6.
94. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995;345:939-44.
95. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, et al. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 1999;17:3553-9.
96. Poplin EA, Benedetti JK, Estes NC, et al. Phase III Southwest Oncology Group 9415/Intergroup 0153 randomized trial of fluorouracil, leucovorin, and levamisole versus fluorouracil continuous infusion and levamisole for adjuvant treatment of stage III and high-risk stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1819-25.
97. Cassidy J, Saltz L, Twelves C, et al. Efficacy of capecitabine versus 5-fluorouracil in colorectal and gastric cancers: a meta-analysis of individual data from 6171 patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011;22:2604-9.
98. Andre T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009;27:3109-16.
99. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, 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;25:2198-204.
100. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1465-71.
101. Meropol NJ. Ongoing challenge of stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:3346-8.

Referencias bibliográficas

102. Sinicrope FA, Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Curr Opin Oncol* 2009;21:369-73.
103. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, et al. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *European journal of cancer* 2009;45:1890-6.
104. Fisher B, Wolmark N, Rockette H, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:21-9.
105. O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS, et al. Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 1994;331:502-7.
106. Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, et al. Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:388-96.
107. Randomised trial of surgery alone versus surgery followed by radiotherapy for mobile cancer of the rectum. Medical Research Council Rectal Cancer Working Party. *Lancet* 1996;348:1610-4.
108. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:709-15.
109. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 2006;24:4620-5.
110. Bosset JF, Calais G, Mineur L, et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. *Lancet Oncol* 2014;15:184-90.

111. Collette L, Bosset JF, den Dulk M, et al. Patients with curative resection of cT3-4 rectal cancer after preoperative radiotherapy or radiochemotherapy: does anybody benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy? A trial of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol* 2007;25:4379-86.
112. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731-40.
113. Sauer R, Liersch T, Merkel S, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 2012;30:1926-33.
114. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, et al. Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol* 2009;27:5124-30.
115. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. Meta-analysis Group In Cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:301-8.
116. Sawada N, Ishikawa T, Sekiguchi F, et al. X-ray irradiation induces thymidine phosphorylase and enhances the efficacy of capecitabine (Xeloda) in human cancer xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1999;5:2948-53.
117. Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, et al. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol* 2010;28:1638-44.
118. Aschele C, Cionini L, Lonardi S, et al. Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2011;29:2773-80.

Referencias bibliográficas

119. Rodel C, Liersch T, Becker H, et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with fluorouracil and oxaliplatin versus fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: initial results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:679-87.
120. Claus Rodel, Torsten Liersch, Fietkau R, et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin versus 5-fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. 2014 ASCO Annual Meeting.
121. Claus Rodel, Torsten Liersch, Rainer Fietkau, et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin versus 5-fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr 3500).
122. Hans-Joachim Schmoll, Karin Haustermans, Timothy Jay Price, et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with capecitabine and oxaliplatin versus capecitabine alone in locally advanced rectal cancer: Disease-free survival results at interim analysis. *J Clin Oncol* 32:5s, (suppl; abstr 3501) 2014.
123. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol* 1997;15:808-15.
124. Hoff PM, Ansari R, Batist G, et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2001;19:2282-92.
125. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol* 2001;19:4097-106.

126. Kohne CH, van Cutsem E, Wils J, et al. Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J Clin Oncol* 2005;23:4856-65.
127. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000;355:1041-7.
128. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:905-14.
129. de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2938-47.
130. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. XELOX vs FOLFOX-4 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. *Br J Cancer* 2011;105:58-64.
131. Garcia-Alfonso P, Munoz-Martin A, Mendez-Urena M, et al. Capecitabine in combination with irinotecan (XELIRI), administered as a 2-weekly schedule, as first-line chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancer: a phase II study of the Spanish GOTI group. *Br J Cancer* 2009;101:1039-43.
132. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:663-71.
133. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011;377:2103-14.
134. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2040-8.

Referencias bibliográficas

135. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337-45.
136. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:2311-9.
137. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010;28:4697-705.
138. Douillard JY, Siena S, Tabernero J, et al. Overall survival (OS) analysis from PRIME: Randomized phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFOX4 for first-line metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3620).
139. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013;369:1023-34.
140. Sebio A, Stintzing S, Stremitzer S, et al. Panitumumab : leading to better overall survival in metastatic colorectal cancer? *Expert Opin Biol Ther* 2014;14:535-48.
141. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:4706-13.
142. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol* 2013;14:749-59.
143. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:1658-64.

144. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626-34.
145. Stintzing S, Jung A, Rossius L, et al. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in FIRE-3: A randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. European Cancer Congress, Amsterdam, 2013, Abstract number 17 2013.
146. Schwartzberg L, Rivera F, Karthaus M, et al. Analysis of KRAS/NRAS mutations in PEAK: A randomized phase II study of FOLFOX6 plus panitumumab (pmab) or bevacizumab (bev) as first-line treatment (tx) for wild-type (wt) KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3631).
147. Patterson S, Peeters M, Siena S, et al. Comprehensive analysis of KRAS and NRAS mutations as predictive biomarkers for single agent panitumumab (pmab) response in a randomized, phase III metastatic colorectal cancer (mCRC) study (20020408). *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3617).
148. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
149. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, et al. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3706-12.
150. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008;26:2013-9.
151. Van Cutsem E, Rivera F, Berry S, et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009;20:1842-7.

Referencias bibliográficas

152. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007;25:1539-44.
153. Horita Y, Yamada Y, Kato K, et al. Phase II clinical trial of second-line FOLFIRI plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer: AVASIRI trial. *Int J Clin Oncol* 2012;17:604-9.
154. Heinemann V, Fischer von Weikersthal L, Decker T, et al. Randomized comparison of FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: German AIO study KRK-0306 (FIRE-3). *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr LBA3506).
155. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol* 2012;30:3499-506.
156. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;381:303-12.
157. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-37.
158. Campbell PM, Der CJ. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2004;14:105-14.
159. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:127-55.
160. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550-62.
161. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;36:320-8.

162. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:2091-6.
163. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010;11:753-62.
164. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992-5.
165. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 2010;304:1812-20.
166. Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol* 2013;31:759-65.
167. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5705-12.
168. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5924-30.
169. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *European journal of cancer* 2012;48:1466-75.
170. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009;69:1851-7.

Referencias bibliográficas

171. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, et al. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:3184-8.
172. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer--results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20:744-53.
173. Wilson PM, Labonte MJ, Lenz HJ. Molecular markers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 2010;16:262-72.
174. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2009;27:5068-74.
175. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3230-7.
176. Lacouture ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2006;6:803-12.
177. Peeters M, Siena S, Van Cutsem E, et al. Association of progression-free survival, overall survival, and patient-reported outcomes by skin toxicity and KRAS status in patients receiving panitumumab monotherapy. *Cancer* 2009;115:1544-54.
178. Douillard JY, Cassidy J, Jassem J, et al. Randomized, open-label phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFOX4 versus FOLFOX4 alone as first-line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer (mCRC): efficacy by skin toxicity (ST). *J Clin Oncol* 2010;28 (suppl 15):3528.
179. Stintzing S, Fischhaber D, Mook C, et al. Clinical relevance and utility of cetuximab-related changes in magnesium and calcium serum levels. *Anticancer Drugs* 2013;24:969-74.

180. Vickers MM, Karapetis CS, Tu D, et al. Association of hypomagnesemia with inferior survival in a phase III, randomized study of cetuximab plus best supportive care versus best supportive care alone: NCIC CTG/AGITG CO.17. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;24:953-60.
181. Vincenzi B, Galluzzo S, Santini D, et al. Early magnesium modifications as a surrogate marker of efficacy of cetuximab-based anticancer treatment in KRAS wild-type advanced colorectal cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011;22:1141-6.
182. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999;274:13176-80.
183. Moriai T, Kobrin MS, Hope C, et al. A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10217-21.
184. Liu W, Innocenti F, Wu MH, et al. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* 2005;65:46-53.
185. Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, et al. Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1427-34.
186. Lurje G, Nagashima F, Zhang W, et al. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:7884-95.
187. Hsieh YY, Tzeng CH, Chen MH, et al. Epidermal growth factor receptor R521K polymorphism shows favorable outcomes in KRAS wild-type colorectal cancer patients treated with cetuximab-based chemotherapy. *Cancer Sci* 2012;103:791-6.

Referencias bibliográficas

188. Garm Spindler KL, Pallisgaard N, Rasmussen AA, et al. The importance of KRAS mutations and EGF61A>G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009;20:879-84.
189. Dahan L, Norguet E, Etienne-Grimaldi MC, et al. Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011;11:496.
190. Zhang W, Park DJ, Lu B, et al. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:600-5.
191. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, et al. Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:500-4.
192. Hu-Lieskovan S, Vallbohmer D, Zhang W, et al. EGF61 polymorphism predicts complete pathologic response to cetuximab-based chemoradiation independent of KRAS status in locally advanced rectal cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:5161-9.
193. Bier H, Hoffmann T, Haas I, et al. Anti-(epidermal growth factor) receptor monoclonal antibodies for the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* 1998;46:167-73.
194. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3712-8.
195. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, et al. Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 2009;27:1122-9.

196. Paez D, Pare L, Espinosa I, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy? *Cancer Sci* 2010;101:2048-53.
197. Geva R, Vecchione L, Kalogeras KT, et al. FCGR polymorphisms and cetuximab efficacy in chemorefractory metastatic colorectal cancer: an international consortium study. *Gut* 2014.
198. Ye JJ, Cao J. MicroRNAs in colorectal cancer as markers and targets: Recent advances. *World J Gastroenterol* 2014;20:4288-99.
199. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005;120:635-47.
200. Chin LJ, Ratner E, Leng S, et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 2008;68:8535-40.
201. Smits KM, Paranjape T, Nallur S, et al. A let-7 microRNA SNP in the KRAS 3'UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:7723-31.
202. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. KRAS-LCS6 genotype as a prognostic marker in early-stage CRC--letter. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18:3487-8; author reply 89.
203. Graziano F, Canestrari E, Loupakis F, et al. Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics J* 2010;10:458-64.
204. Zhang W, Winder T, Ning Y, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011;22:104-9.

Referencias bibliográficas

205. Saridaki Z, Weidhaas JB, Lenz HJ, et al. A let-7 microRNA-Binding Site Polymorphism in KRAS Predicts Improved Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Salvage Cetuximab/Panitumumab Monotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20:4499-510.
206. Mao Y, Li Y, Jing F, et al. Association of a genetic variant in microRNA-146a with risk of colorectal cancer: a population-based case-control study. *Tumour Biol* 2014.
207. Li L, Sheng Y, Lv L, et al. The association between two microRNA variants (miR-499, miR-149) and gastrointestinal cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e81967.
208. Du W, Ma X, Kong W, et al. Association between rs11614913 polymorphism in miR-196a2 and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Biomark* 2013;13:457-64.
209. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330-8.
210. Horie N, Aiba H, Oguro K, et al. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995;20:191-7.
211. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, et al. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer research* 1999;19:3249-52.
212. Kawakami K, Salonga D, Park JM, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001;7:4096-101.
213. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003;63:2898-904.

214. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:1779-86.
215. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, et al. Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2007;50:1363-9.
216. Lamas MJ, Duran G, Gomez A, et al. X-ray cross-complementing group 1 and thymidylate synthase polymorphisms might predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;82:138-44.
217. Paez D, Salazar J, Pare L, et al. Pharmacogenetic study in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy: polymorphisms in thymidylate synthase, epidermal growth factor receptor, GSTP1, and DNA repair genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;81:1319-27.
218. Gillet LC, Scharer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* 2006;106:253-76.
219. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19:4298-304.
220. Yin M, Yan J, Martinez-Balibrea E, et al. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:1632-40.
221. Zhang W, Labonte MJ, Lenz HJ. KRAS let-7 LCS6 SNP predicts cetuximab efficacy in KRASwt metastatic colorectal cancer patients: Does treatment combination partner matter? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011;22:484-5.
222. Ruzzo A, Canestrari E, Galluccio N, et al. Role of KRAS let-7 LCS6 SNP in metastatic colorectal cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011;22:234-5.

Referencias bibliográficas

223. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2006;29:903-6.
224. Crowley EH, Arena S, Lamba S, et al. Targeted knock-in of the polymorphism rs61764370 does not affect KRAS expression but reduces let-7 levels. *Hum Mutat* 2014;35:208-14.
225. Ecker JR, Bickmore WA, Barroso I, et al. Genomics: ENCODE explained. *Nature* 2012;489:52-5.
226. Dhadda AS, Dickinson P, Zaitoun AM, et al. Prognostic importance of Mandard tumour regression grade following pre-operative chemo/radiotherapy for locally advanced rectal cancer. *European journal of cancer* 2011;47:1138-45.
227. Claus Rodel, Torsten Liersch, Rainer Fietkau, et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin versus 5-fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 32:5s, (suppl; abstr 3500) 2014.
228. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:579-88.
229. Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, et al. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1999;5:2884-90.
230. Milas L, Fan, Z., M Ason, K.A. adn ANg, K.K. Role of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its inhibition in radiotherapy. 2003.
231. Clancy C, Burke JP, Coffey JC. KRAS mutation does not predict the efficacy of neo-adjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol* 2013;22:105-11.

232. Balboa E, Duran G, Lamas MJ, et al. Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response. *Pharmacogenomics* 2010;11:747-61.

