



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

ARNs no codificantes como biomarcadores predictivos y pronósticos de la quimio-radioterapia neoadyuvante en cáncer de recto

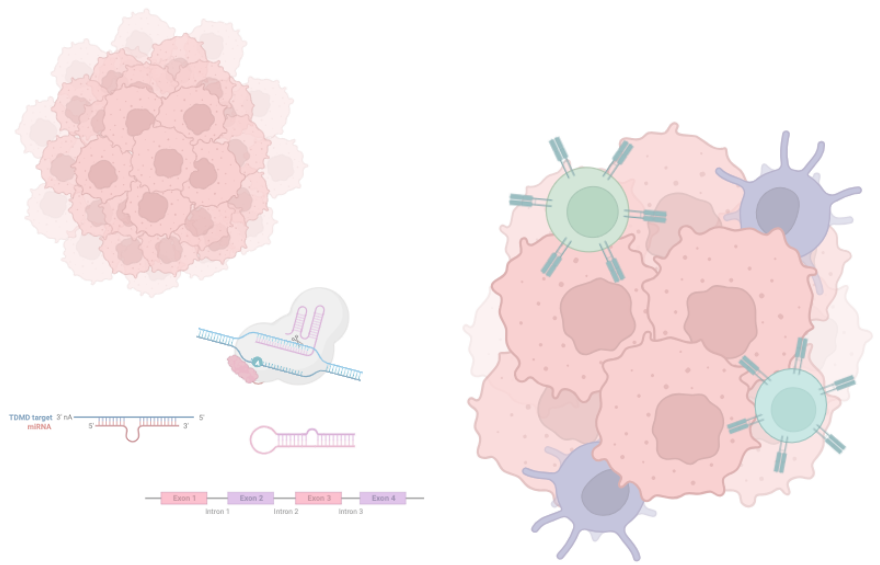
José Carlos Benítez Montañez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



**ARNs no codificantes como
biomarcadores predictivos y pronósticos
de la quimio-radioterapia neoadyuvante en
cáncer de recto**

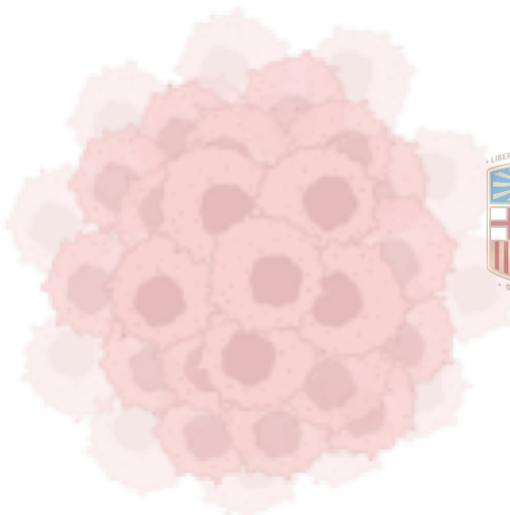
José Carlos Benítez Montañez

DIRECTORES

Dr. Marc Campayo Guillaumes

Dr. Alfons Navarro Ponz

2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Mútua Terrassa



TESIS DOCTORAL

**ARNs no codificantes como
biomarcadores predictivos y pronósticos
de la quimio-radioterapia neoadyuvante en
cáncer de recto**

Memoria de tesis Doctoral presentada por **José Carlos Benítez Montañez**
para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

**Programa de Doctorado en Medicina
e Investigación Translacional**

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud.

Universidad de Barcelona,

Noviembre 2023

Tesis realizada bajo la dirección del **Dr. Marc Campayo Guillaumes (co-director)**, del departamento de Oncología Médica del Hospital Universitari Mutua de Terrassa (*actualmente el Dr. Campayo forma parte del departamento de Oncología Médica del Consorci Sanitari de Terrassa), y del **Dr. Alfons Navarro Ponz (co-director y tutor)**, del departamento de Cirugía y Especialidades Medicoquirúrgicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universitat de Barcelona.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

AGRADECIMIENTOS

Por tantas noches y tantos madrugones, por tantos viajes, idas y venidas, no estaría donde estoy sin ti, María, te doy las gracias por tu apoyo incondicional en este largo proceso, por entenderme y comprenderme, por apoyarme en cada paso que he querido dar y por heberme hecho mejor persona para poder alcanzar mis objetivos. Espero poder ensañar a Paula el camino del esfuerzo, la ilusión y la perseverancia que tanto valoro.

A mi familia, sobre todo a mi madre, mi hermana y mis abuelos maternos, sin su apoyo desde el primer día y sin ellos no sería lo que soy.

Gracias a cada una de las personas que han contribuido a mi forma de pensar, de tratar, de estudiar y de ver y descubrir el mundo de la oncología y la investigación; especialmente a mis mentores Marc Campayo y Benjamin Besse.

A mis tutores/directores de tesis, por su apoyo durante este largo proceso para que haya podido alcanzar la meta.

Por último, a los pacientes y sus familiares, sin ellos los investigadores y oncólogos no podríamos avanzar en la ciencia de la oncología, por su altruismo y por su dedicación a la vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
SINOPSIS	18
INTRODUCCIÓN	21
1.1. Cáncer de recto	22
<i>1.1.1. Epidemiología del cáncer de recto</i>	22
<i>1.1.2. Características generales del cáncer de recto</i>	23
1.1.2.1. Anatomía.....	23
1.1.2.2. Histología.....	27
1.1.2.3. Clasificación del cáncer de recto	32
1.1.2.4. Anatomía patológica	36
1.1.2.5. Bases moleculares.....	37
<i>1.1.3. Cáncer de recto localmente avanzado (CRLA)</i>	38
1.1.3.1. Tratamiento neoadyuvante del CRLA	38
1.1.3.1.1. Radioterapia	39
1.1.3.1.2. Quimioterapia.....	41
1.1.3.1.3. Toxicidades	47
1.1.3.2. Tratamiento adyuvante del CRLA	49
1.1.3.2.1. Quimioterapia con 5-FU en monoterapia.....	49
1.1.3.2.2. Quimioterapia con 5FU y oxaliplatino.....	51
1.1.3.2.3. Caso especial de pacientes con respuesta completa tras QRT	52
1.1.3.3. Cirugía de los tumores de recto localmente avanzado.....	53
1.1.3.3.1. Evaluación inicial previa a la cirugía	53
1.1.3.3.2. Métodos quirúrgicos.....	55
1.1.3.3.3. Tipos de escisión quirúrgica de los tumores no superficiales de recto .	56
1.1.3.4. Factores pronósticos del CRLA	58
1.1.3.4.1. Factores patológicos.....	60
1.1.3.4.1.1. Extensión local del tumor	60
1.1.3.4.1.2. Tumor residual tras la resección	62
1.1.3.4.1.3. Radio circunferencial del margen	62
1.1.3.4.1.4. Ganglios linfáticos regionales.....	64

1.1.3.4.1.5. Invasión micronodular	65
1.1.3.4.1.6. Invasión extramural.....	66
1.1.3.4.1.7. Regresión tumoral tras el tratamiento preoperatorio.....	66
1.1.3.4.1.8. Invasión renovascular	66
1.1.3.4.1.9. Invasión peri neural.....	67
1.1.3.4.1.10. Tipo histológico, grado de diferenciación y presencia de mucina	67
1.1.3.4.1.11. Reborde tumoral	67
1.1.3.4.1.12. Otros factores pronósticos Respuesta inmune del paciente.....	67
1.1.3.4.2. Factores clínicos	68
1.1.3.4.2.1. Niveles de Antígeno carcinoembrionario (CEA) preoperatorio	68
1.1.3.4.2.2. Obstrucción o perforación intestinal	68
1.1.3.4.2.3. Factores moleculares	69
1.1.3.5. Factores predictivos de cáncer colorrectal	69
1.1.3.6. Seguimiento	71
1.2. ARNs no codificantes	73
1.2.1. Generalidades de los ARNs no codificantes	73
1.2.2. MiARNs (miRNAs)	74
1.2.2.1. Biogénesis de los miRNAs	74
1.2.2.2. Funciones y regulación de la expresión de los miRNAs	77
1.2.2.3. miRNAs y cáncer	81
1.2.2.4. miRNAs en cáncer de recto	85
1.2.3. ARNs no codificantes de cadena larga (lncRNAs)	91
1.2.3.1. Clasificación y características de los lncRNAs	91
1.2.3.2. Mecanismos de acción y función de los lncRNAs.....	94
1.2.3.3. LncRNAs y cáncer	98
1.2.3.4. LncRNAs y CR.....	103
1.2.4. LincRNA-p21	105
1.2.4.1. Mecanismos de acción y procesos celulares con participación de lincRNA-p21	106
1.2.4.2. Relación entre lincRNA-p21 y miRNAs	113
1.2.4.3. LincRNA-p21 y cáncer	114

1.2.4.4. LincRNA-p21 y CCR	116
HIPÓTESIS	118
OBJETIVOS	120
MATERIAL Y MÉTODOS, RESULTADOS	122
1.3. Primera parte: firma de miRNAs como biomarcadores de respuesta a tratamiento neoadyuvante del CRLA	123
1.3.1. Resumen del artículo 1	123
Artículo 1: Marc Campayo, Alfons Navarro, José Carlos Benítez , Sandra Santasusagna, Carme Ferrer, Mariano Monzo, Luis Cirera. MiR-21, miR-99b and miR-375 combination as predictive response signature for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. PLoS One. 2018;13(11). doi:10.1371/journal.pone.0206542.....	124
1.4. Segunda parte: LincRNA-p21 como biomarcador predictivo y pronóstico de respuesta a QRT en CRLA	124
1.4.1. Resumen artículo 2	124
Artículo 2: Jose Carlos Benítez , Marc Campayo, Tania Díaz, Carme Ferrer, Melissa Acosta-Plasencia, Mariano Monzo, Luis Cirera, Benjamin Besse, Alfons Navarro. Personalized Medicine Lincp21-RNA as Predictive Response Marker for Preoperative Chemoradiotherapy in Rectal Cancer. Journal of Personalized Medicine. 2021;11(5):420. doi:10.3390/jpm11050420.	124
DISCUSIÓN	125
CONCLUSIONES	136
BIBLIOGRAFÍA	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los tumores de colon y recto de la Organización Mundial de la Salud (OMS).	28
Tabla 2. Estadificación de grados histológicos descrita por el colegio americano de patólogos.	30
Tabla 3. Octava edición de la clasificación TNM, publicada en 2017.	33
Tabla 4. Estadíos de enfermedad según la clasificación TNM 8 edición 2017.	35
Tabla 5. Clasificación de la respuesta histológica según los criterios de Dworak.	36
Tabla 6. Supervivencia libre de enfermedad en el ensayo del German Rectal Cancer Study Group (CAO/ARO/AIO-94).	59
Tabla 7. Definición de la calidad de resección quirúrgica de estadíos no metastásicos.	62
Tabla 8. Clasificación de la calidad y la integridad del mesorrecto en una escisión mesorrectal total.	63
Tabla 9. Representación de miRNAs oncogénicos y supresores de tumores con evidencia científica <i>in vivo</i> .	84
Tabla 10. Representación gráfica de los principales lncRNAs que se han relacionado con los diferentes subtipos tumorales.	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras anatómicas que conforman el recto y el canal anal.	24
Figura 2. Anatomía linfática y vascular del recto. Las flechas indican la posibilidad de diseminación tumoral vía linfática.	27
Figura 3. Carcinoma en anillo de sello dentro de un pólipo adenomatoso.	31
Figura 4. Ejemplos de resonancias magnéticas de pacientes que muestran cáncer de recto localmente avanzado con características de alto riesgo.	54
Figura 5. Clasificación de Rullier.	58
Figura 6. Tasas de supervivencia de adenocarcinoma de recto.	57
Figura 7. Representación gráfica de la estadificación de los tumores de recto.	64
Figura 8. Representación gráfica de la biogénesis de los miRNAs.	76
Figura 9. Representación de la biogénesis de los miRNAs y los mecanismos de silenciamiento de genes celulares.	77
Figura 10. Modelo esquemático que muestra los mecanismos moleculares de los miRNAs que actúan en la patogénesis del cáncer.	83
Figura 11. Representación gráfica de los tipos de lncRNAs más comunes según su localización genómica.	93
Figura 12. Representación esquemática de los mecanismos celulares que involucran lncRNAs.	98
Figura 13. Representación gráfica de los principales lncRNAs que se han relacionado con los diferentes subtipos tumorales.	100
Figura 14. Representación gráfica de las principales vías de actuación de lincRNA-p21 en la apoptosis y la proliferación celular.	108
Figura 15. Representación gráfica de los mecanismos regulatorios de lincRNA-p21.	109
Figura 16. Representación gráfica de los principales mecanismos de lincRNA-p21 en cáncer.	113
Figura 17. Representación gráfica de los principales miRNAs identificados con los que lincRNA-p21 puede interactuar en las diferentes vías biológicas celulares.	114

ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
5-FU	5-fluorouracilo
AA	anillo anal (borde superior del esfínter)
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ARN	Ácido ribonucleico
ASA	escala de la sociedad americana de anestesia
ASCO	Sociedad Americana de Oncología Clínica
AUC	Area under the curve
CAP	College of American Pathologists
CCR	cáncer colorrectal
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CIN	vía de inestabilidad cromosómica
cm	centímetro
COX-2	ciclooxigenasa-2
circRNA	ARN circulantes
CR	Cáncer de recto
CRLA	cáncer de recto localmente avanzado
CRM	margen resección
dMMR	Deficiencia del sistema de reparación (Deficient mismatch repair en inglés)
DPD	dihidropirimidina deshidrogenasa
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica
ETM	escisión total del mesorrecto
Gy	Grey
HR	Hazard ratio
IC	Intervalo de confianza
ICP	índice de carcinomatosis peritoneal
LCRT	long course RT
LD	línea dentada (línea pectinada)
let-7	Micro ARN lethal-7
LincRNA-p21	ARN intergénico largo no codificante p21
LLC	leucemia linfocítica crónica
lnc-DC	lnc de células dendríticas

lncRNA	ARN no codificante de cadena larga
MA	margen anal
MiNEN	Neoplasia mixta neuroendocrina y no neuroendocrina
miRNA	micro ARN
MPT	Modificaciones postraduccionales
mRNA	ARN mensajero
MSI	inestabilidad de microsatélites
MSI-H	alta inestabilidad de microsatélites
MSK	Memorial Sloan Kettering
NCCN	National comprehensive natiotal network
ncRNA	ARN no codificante
OMS	Organización mundial de la salud
OR	Odds ratio
pCR	Remisión patológica completa
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1 (Programmed cell death protein 1 en Inglés)
PD-L1	Ligando 1 de la proteína de muerte celular programada (Programmed cell death ligand protein 1 en inglés)
PDX	Patient-derived Xenograft
piRNA	piwi-ARN
qPCR	Cadena reactiva de la polimerasa cuantitativa (quantitative PCR en Inglés)
QRT	quimio-radioterapia
QT	quimioterapia
R0	Resección quirúrgica completa
R1	Resección quirúrgica con afectación microscópica del margen
R2	Resección quirúrgica con afectación microscópica del margen
RM	Resonancia magnética
ROC	curva ROC (receiver operating characteristic curve en inglés)
RT	radioterapia
rt-PCR	Cadena reactiva de la polimerasa en tiempo real (real time PCR en inglés)
SCRT	Radioterapia de curso corto (short course RT en inglés)
SEER	Registro norteamericano de patología
SG	Supervivencia Global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad

snRNA	ARN nucleolar de cadena corta (small nucleolar RNA en inglés)
TCGA	Atlas del genoma del cáncer
TLE	Tiempo libre de enfermedad
TNM	Estadío internacional del cancer basado en el Tamaño, Nodulos afectados y metástasis a distancia
TNT	tratamiento neoadyuvante total
TRG	Tumor Regression Grade
tRNA	ARN transferente
tsRNA	ARN transferente derivado de pequeños ARNs (transfer RNA [tRNA]-derived small RNAs) en inglés)
TTR	Tiempo hasta la recaída
UICC	Unión internacional contra el cáncer
UTR	Región no traslocada (Untranslated región en inglés)
UVB	Radiación de rayos ultravioletas tipo B
ypTNM	Estadio patológico posterior al tratamiento

GEN	Descripción
AIR	Autimmune regulator
AKAP-9	A-Kinase Anchoring Protein 9
AKT	alpha serine/threonine-protein kinase
ANRIL	Antisense RNA In The INK4 Locus
APC	Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor
BCAR4	antiestrogene 4
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-W	B-cell lymphoma X
Bcl-XL	B-cell lymphoma XL
BMI1	BMI1 Polycomb Ring Finger Proto-Oncogene
BRAF	Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
BRCA1	Breast And Ovarian Cancer Susceptibility Protein 1
CARF	Calcium Responsive Transcription Factor
CBX7	Chromobox 7
CCAT1	Colon cancer-associated transcript 1
CCAT2	Colon cancer-associated transcript 2
CCND1	Cyclin D1
CCND2/E2	Cyclin D2 and E2
CDK6	cyclin dependent kinase 6

CDX2	homeobox 2 de tipo caudal
CK20	citoqueratine 20
COX-2	ciclooxigenase-2
CTNNB1	Catenin Beta 1
dMMR	mismatch repair deficient
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
FAL1	focally amplified lncRNA on chromosome 1
GADD45A	Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha
GAS5	Growth Arrest Specific 5
H3K27	Histone 3 lisine 27
H3K4	Histone 3 lisine 4
H3K9	Histone 3 lisine 9
H4K20	Histone 4 lisine 20
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
hnRNP-K	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K
HOTAIR	HOX Transcript Antisense RNA
IGF1	Insulin Like Growth Factor 1
JAK2	Janus Kinase 2
LATS2	Large Tumor Suppressor Kinase 2
MALAT1	Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
MCL-1	MCL1 Apoptosis Regulator (BCL2 Family Member)
MDM2	Mouse double minute 2 homolog (E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2)
MEG3	Maternally Expressed 3
MLH1	MutL Homolog 1
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
neat1	Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1
NF-jB	Nuclear Factor jB
NF-kB	Nuclear Factor Kappa B
NKILA	NF-KappaB Interacting LncRNA
NORAD	Non-Coding RNA Activated By DNA Damage
PAK6	proteína quinasa 6 activada por p21
PCBD2	Pterin-4 Alpha-Carbinolamine Dehydratase 2
PCGEM1	PCGEM1 Prostate-Specific Transcript

PD-1	Programmed Cell Death 1
PD-L1	Programmed Cell Death ligand 1
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
PKM2	Pyruvate Kinase M2
PMS2	PMS1 Homolog 2
POLII	RNA polymerase II (
PRC1	Protein Regulator Of Cytokinesis 1
PRC2	Protein Regulator Of Cytokinesis 2
PRNCR1	Prostate Cancer Associated Non-Coding RNA 1
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PUMILIO	Pumilio RNA Binding Family
RAS	rat sarcoma virus
RB2	Retinoblastoma gene homolog 2
SCAP	SREBF Chaperone
SHIP1	Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase D
SNAI2	Snail Family Transcriptional Repressor 2
SRC	Rous sarcoma virus
SREBP-1	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1
SFRP1	Secreted Frizzled-related protein 1
SRSF1	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SWI/SNF	Regulator of chromatin complex
Tcf21	ranscription Factor 21
TERC	Telomerase RNA Component
TGF-b	Transforming Growth Factor Beta
THOR	Testis Associated Oncogene
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von Hippel-Lindau
WIF1	Wnt inhibitor factor 1
Xist	X Inactive Specific Transcript
XRN2	5'-3' Exoribonuclease 2

Esta memoria de tesis en formato de compendio de publicaciones.

La tesis consta de dos objetivos y dos artículos:

- Artículo 1: Marc Campayo, Alfons Navarro, Jose Carlos Benítez, Sandra Santasusagna, Carme Ferrer, Mariano Monzo, Luis Cirera. MiR-21, miR-99b and miR-375 combination as predictive response signature for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. PLoS One. 2018;13(11). doi:10.1371/journal.pone.0206542. **IF: 2.776, Q: 2.**

- Artículo 2: Jose Carlos Benitez, Marc Campayo, Tania Díaz, Carme Ferrer, Melissa Acosta-Plasencia, Mariano Monzo, Luis Cirera, Benjamin Besse, Alfons Navarro. Personalized Medicine Lincp21-RNA as Predictive Response Marker for Preoperative Chemoradiotherapy in Rectal Cancer. Journal of Personalized Medicine. 2021;11(5):420. doi:10.3390/jpm11050420. **IF: 3.508, Q: 2.**

SINOPSIS

ARNs no codificantes como biomarcadores predictivos y pronósticos de la quimio-radioterapia neoadyuvante en cáncer de recto

Introducción: El cáncer colorrectal es uno de los tumores más frecuentes en ambos sexos. En este contexto, es de especial interés el estudio del cáncer de recto, cuyo tratamiento principal cuando no es metastásico es la resección completa del tumor. La quimio-radioterapia (QRT) preoperatoria es el tratamiento estándar para pacientes con cáncer de recto localmente avanzado (estadío clínico III). Su objetivo principal es obtener la mejor respuesta tumoral posible para conseguir una resección quirúrgica completa y con la preservación de las estructuras colindantes con el recto, como el esfínter anal, que permita mantener la calidad de vida de los pacientes con las mínimas comorbilidades.

Hipótesis: Sin embargo, a pesar de los beneficios de la QRT, su uso en pacientes en los que no se consigue una respuesta tumoral satisfactoria puede asociarse con un aumento de la toxicidad y de las comorbilidades, con el retraso de la resección quirúrgica, afectando a la calidad de vida de los pacientes o al desarrollo tumoral. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores de respuesta al tratamiento neoadyuvante que nos ayude a identificar a los pacientes que se beneficiarán del mismo, podría mejorar el manejo de la enfermedad localmente avanzada en este contexto. En relación con la identificación de biomarcadores en cáncer, se han identificado en los últimos años regiones del ADN no codificantes que tienen un papel muy importante en el control de la expresión de los genes, los ARN no codificantes, entre los que se encuentran estructuras como los microRNAs o los ARN no codificantes de cadena larga. Estas estructuras genéticas están desreguladas en diferentes enfermedades, pero es de especial interés su participación en el desarrollo y el pronóstico del cáncer y en la predicción de la respuesta a los tratamientos contra el mismo.

Objetivo: En los trabajos que componen esta tesis doctoral hemos estudiado la expresión de varios microRNAs (miRNAs) (ARNs no codificantes de cadena corta de unos 20 nucleótidos de longitud) y de un ARN no codificante de cadena larga (ARNs no codificantes de > 200 nucleótidos de longitud) el lincRNA-p21 y su potencial papel como marcador pronóstico y

de respuesta a la QRT neoadyuvante.

Métodos: Los análisis se realizaron en biopsias de endoscopia recogidas antes del tratamiento preoperatorio de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado tratados con QRT previa a la cirugía. Se estudió el ARN de biopsias de una cohorte de 114 pacientes con cáncer de recto. La respuesta patológica se clasificó según la clasificación de Dworak del grado de regresión tumoral para ambos análisis. El primer trabajo se llevó a cabo en dos fases: una primera fase exploratoria, en la que se estudiaron 377 miRNAs en 12 pacientes que tuvieron respuestas extremas a la QRT (6 pacientes cuyo tumor no obtuvo respuesta o TRG0-1 vs 6 pacientes con una respuesta completa o TRG4). Se identificó una firma de respuesta compuesta por 8 miRNAs: let-7b, let-7e, miR-21, miR-99b, miR-183, miR-328, miR-375 y miR-483-5p. El papel potencial como biomarcadores predictivos de la respuesta a la QRT, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de los miRNAs identificados se validó en toda la cohorte (n=96). En el segundo trabajo se estudió lincRNA-p21, que se ha demostrado que está involucrado en la vía de p53 y en la regulación de la angiogénesis con un papel potencial en la respuesta a la quimioterapia y la radioterapia. Nuestro objetivo fue estudiar si los niveles de expresión de lincRNA-p21, determinada mediante RTqPCR, podía ser un biomarcador predictivo de respuesta a QRT neoadyuvante.

Resultados: Los resultados de nuestros experimentos demuestran que miR-21, miR-99b, miR-375, let-7b y lincRNA-p21 pueden ser biomarcadores predictivos del beneficio de la QRT en pacientes no tratados previamente. Aquellos pacientes cuyos tumores presentaban altos niveles de expresión de lincRNA-p21, miR-21, miR-99b, miR-375 y/o let-7b en las muestras de tumor obtenidas al diagnóstico tuvieron una peor respuesta al tratamiento. Los pacientes que presentaban altos niveles de lincRNA-p21 presentarán un menor tiempo a la recidiva y, los pacientes con niveles bajos de miR-328 y/o let-7e recidivaban antes con una peor supervivencia global.

Conclusiones: Aunque se trata de un estudio retrospectivo cuyos análisis deben validarse en una cohorte prospectiva, los biomarcadores subrogados identificados podrían ser una buena herramienta para individualizar el tratamiento en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado, evitando el retraso en el tratamiento quirúrgico y posibles toxicidades y/o comorbilidades.

INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de recto

1.1.1. Epidemiología del cáncer de recto

El cáncer colorrectal (CCR) representa la tercera neoplasia más frecuente en hombres y la segunda en mujeres, lo que se traduce en un 10% del total de los tumores diagnosticados. Este tumor se diagnostica con una mayor incidencia en hombres (un 25% mayor respecto a las mujeres si hablamos exclusivamente de cáncer rectal) y su frecuencia es muy diferente entre países(1–3). Históricamente se ha considerado un tumor de países desarrollados, sin embargo, la incidencia creciente en algunos países en desarrollo refleja que su etiología está ligada a los cambios en los estilos de vida como la obesidad, el sedentarismo, el consumo de alcohol, un abundante consumo de carnes rojas y el tabaco(4,5). Además, son muy interesantes los datos aportados por estudios recientes que relacionan un papel destacado de los cambios causados por estos factores en la microbiota como la carcinogénesis de este tipo de tumor sólido(6).

El cáncer de recto (CR) se puede considerar una entidad diferente a los tumores de colon, de hecho, representa aproximadamente un 35% de la incidencia total del cáncer colorrectal, lo que se traduce en unos 15 a 25 casos por cada 100 000 habitantes, incluso se espera un incremento de estos datos en el futuro próximo para ambos sexos(1,2). En la Unión Europea tenemos una incidencia de unos 125 000 casos por año. Suele diagnosticarse en personas de 70 años (la mediana de incidencia) aunque se espera que aumente la mediana de edad en los próximos años(3). En los últimos años se han acumulado datos que apoyan el hecho de que se trata de un tipo tumoral diferente al cáncer de colon, con diferentes factores de riesgo y etiología, probablemente debido a una exposición ambiental diferente. Podemos destacar un elevado índice de masa corporal, el acumulo de grasa corporal o abdominal y la diabetes *mellitus* tipo 2 como los factores de riesgo principales. Otros factores etiológicos pueden ser la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn de larga duración que afectan al recto, el consumo en exceso de carnes rojas o procesada y el consumo habitual o moderado de tabaco y alcohol.

Se han publicado numerosos estudios que demuestran que un estilo de vida saludable y el ejercicio físico pueden reducir el riesgo de desarrollar CR(7–9). Además, el consumo de ciertos alimentos como el ajo, la leche, o una dieta rica en calcio y en fibra han demostrado tener un papel protector(9–12). También hay otros factores que se han estudiado como posibles protectores del desarrollo del cáncer colorrectal como el uso regular de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)(13,14), dado su efecto sobre la vía de las prostaglandinas E₂-EP₂(15), o el efecto antitumoral de la vitamina D(16,17). Cabe destacar un ensayo clínico aleatorizado que estudió el uso de 600 mg de aspirina al día durante 2 años como quimio prevención, con resultados positivos en. La reducción de incidencia de cáncer colorrectal y otros tipos de tumores relacionados con el síndrome de Lynch. No se encontraron diferencias de toxicidad farmacológica de la aspirina en comparación con el placebo(18). Este estudio, junto con la evidencia aportada por otros en el mismo sentido, apoyan el uso de aspirina como tratamiento quimiopreventivo en pacientes con síndrome de Lynch a pesar de que la dosis y el tiempo de uso no han sido bien establecidos. De hecho, no existen en la actualidad recomendaciones de prevención primaria para estos tumores(19,20).

1.1.2. Características generales del cáncer de recto

1.1.2.1. Anatomía

La anatomía del recto puede ser confusa dado que existen diferentes definiciones de los principales límites anatómicos. Como ejemplo, en la porción superior hay diferentes cambios en la musculatura del intestino grueso y en su relación con el peritoneo, muy próximas. Por otro lado, en el tercio inferior del recto los cambios en la mucosa se sitúan casi en la misma localización que el esfínter anal(21–23).

El recto se divide anatómicamente en 3 porciones o tercios (**Figura 1**):

- El **tercio inferior** se enmarca en el área situada entre el margen anal y 3 a 6 centímetros (cm) hacia el recto.
- El **tercio medio** abarca desde los 5-6 cm hasta los 8-10 cm desde el margen anal.
- El **tercio superior** está definido por el área que hay desde los 12 a 15 cm desde el margen anal, aunque la porción intraperitoneal del intestino grueso (Sigma) generalmente alcanza su límite aproximadamente a los 12 cm de dicho margen. En algunos pacientes, especialmente en mujeres mayores, la porción intraperitoneal del

intestino grueso puede localizarse bastante más abajo.

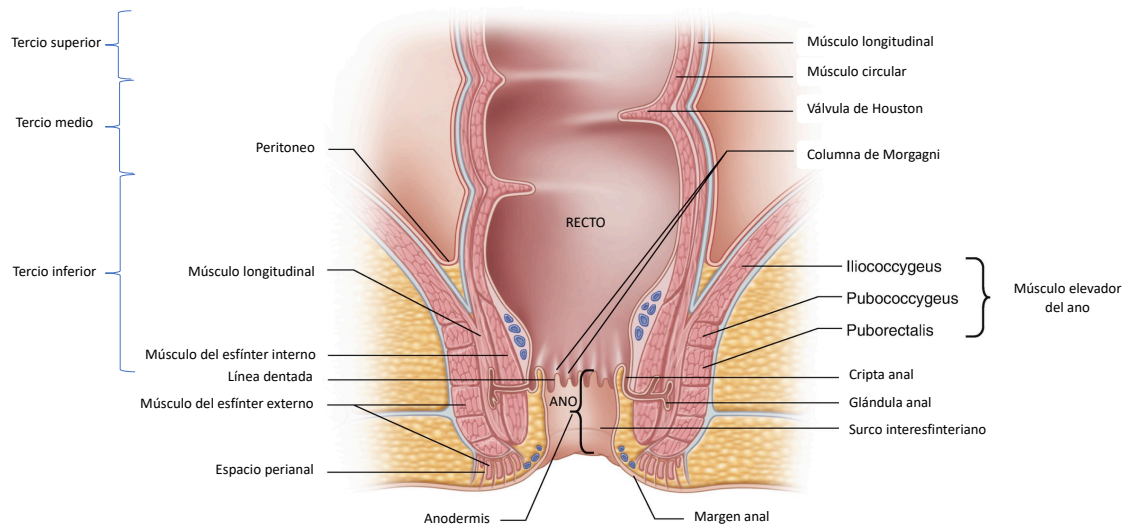


Figura 1. Representación gráfica de las diferentes estructuras anatómicas que conforman el recto y el canal anal. Límites anatómicos que demarcan el recto en tres tercios definidos por la distancia de dichos límites respecto al margen anal. Adaptación de (22)

La definición y determinación de la localización de los márgenes entre el recto y el sigma es importante a la hora de definir el tratamiento adyuvante. El recto se suele definir en la práctica como el tramo de intestino grueso situado inmediatamente después del colon sigmoide y previo al canal anal.

Desde la parte exterior al órgano, el recto puede ser identificado por la desaparición de la tenia que identifica el colon sigmoide y su extensión a la capa muscular. El tercio superior está rodeado por el peritoneo por su cara anterior y lateral, la parte posterior es intraperitoneal y no presenta una capa serosa. Las capas rectovesical o rectouterina del recto son completamente subperitoneales. El recto sigue la curvatura del sacro en sus dos tercios inferiores y entra en el canal anal a nivel del elevador del ano. El anillo ano-rectal se sitúa al nivel del resorte puborectal de los músculos elevadores(24).

La localización del recto, como hemos comentado anteriormente, se suele definir por la distancia entre el margen anal, la línea dentada o el anillo anorectal y la cara inferior de dicho tramo de tracto digestivo. Estos márgenes suelen ser diferentes entre los pacientes afectados de cáncer de recto. Además, estas medidas pueden variar dependiendo de los métodos que se

usen para su evaluación. Este hecho puede ser muy importante, ya que la medición por un endoscopio flexible podría sobrestimar la distancia del tumor respecto al margen anal o los demás límites. Podemos decir que la distancia desde la musculatura del esfínter anal es clínicamente más importante que con el margen anal, ya que está íntimamente relacionada con la habilidad de realizar una intervención quirúrgica con preservación del esfínter anal(24).

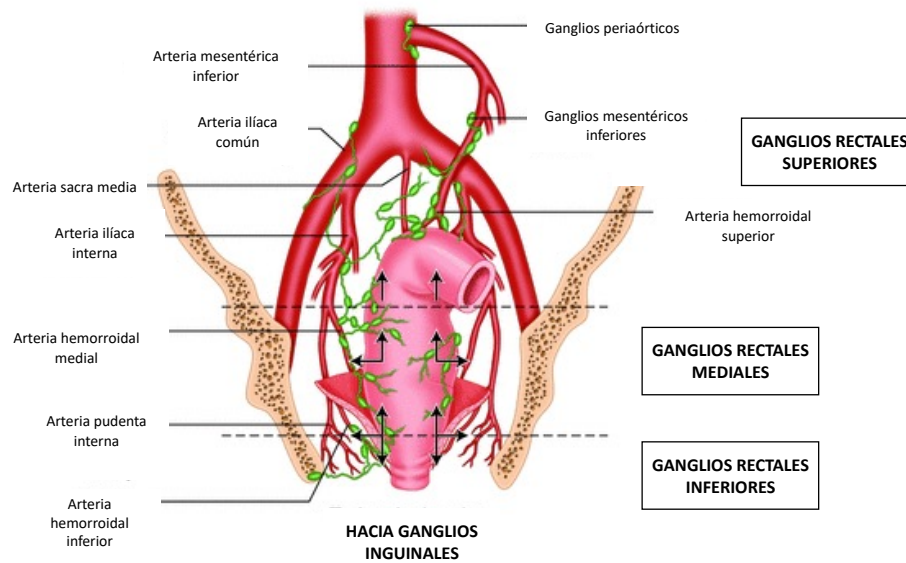
Cabe destacar que la ausencia de un recubrimiento peritoneal de la mayor parte del recto es una de las razones por las que hay un mayor porcentaje de recidiva local tras una cirugía primaria cuando comparamos los resultados con los de cáncer de colon. El mesorecto se suele usar como la estructura que define la extensión total de una resección mesorectal, con la mayoría de la grasa perirectal y de los ganglios perirectales dentro de sus márgenes(21).

Es importante destacar 3 particularidades anatómicas y fisiológicas del recto, a tener en cuenta en los diferentes tipos de tratamientos locales que podemos realizar con la aparición de tumores(21):

- 1- Drenaje linfático: Los ganglios linfáticos del tercio superior del recto se sitúan a lo largo del territorio de la arteria hemorroidal superior y hacia la arteria mesentérica inferior. Los ganglios linfáticos situados por encima del tercio medio del recto y que, por tanto, drenan a la arteria hemorroidal superior, son muchas veces resecaados durante la resección del mesenterio en las intervenciones de la porción intraperitoneal del colon. Las lesiones que se sitúan a unos 6 cm del margen anal se sitúan en un territorio ganglionar que drena a la arteria hemorroidal media. Por tanto, los nódulos implicados con tumores con esta situación anatómica pueden incluir los de la arteria ilíaca interna y aquellos situados en la fosa del obturador. Esta información toma especial relevancia en la resección y la irradiación de las lesiones de dicha localización. Por otro lado, cuando los tumores se sitúan en la región situada por debajo de la línea dentada, el drenaje linfático va a transcurrir a los nódulos inguinales y del territorio de la cadena ilíaca externa, con una gran importancia también a la hora de determinar los campos de irradiación. Como consecuencia de este alto riesgo de diseminación inguinal de los tumores situados muy bajos anatómicamente es que aquellos tumores situados por encima de la línea serrata presentan un riesgo muy bajo

de diseminación linfática inguinal y, normalmente junto a las cadenas ilíacas externas, no requieren tratamiento (**Figura 2**).

- 2- Función esfinteriana: La continencia fecal es mantenida gracias al control esfinteriano y a la preservación de la anatomía muscular normal del órgano, que provocan un ángulo o curvatura rectal. El suelo pélvico está compuesto por los músculos elevadores del ano, que separan la pelvis del peritoneo y la fosa isquiorectal. A través de los músculos elevadores del ano van a atravesar la uretra, la vagina y el ano. Una buena comprensión de la anatomía muscular y esfinteriana va a ser clave para la preservación de la continencia fecal durante la resección quirúrgica. Por ejemplo, mantener el esfínter sin la preservación del ángulo rectal no va a proporcionar resultados satisfactorios en este sentido. Dichas limitaciones anatómicas, junto con el respeto a los márgenes laterales durante la resección, hacen que la quimioterapia y la radioterapia adyuvantes tengan un papel fundamental en conseguir el objetivo principal de la cirugía, eliminar por completo la enfermedad. Este detalle va a ser muy importante tanto desde el punto de vista oncológico como fisiológico.
- 3- Sistema nervioso autónomo: La preservación de la función vesical y sexual va a depender también de la buena comprensión de la anatomía rectal y del sistema nervioso autónomo que infiltra los órganos pélvicos por parte del cirujano. El plexo hipogástrico está formado por ramas simpáticas que transcurren por el promontorio sacro. Estos nervios simpáticos se sitúan por debajo del peritoneo a lo largo de la pared lateral del mesorecto. Las raíces sacras segunda, tercera y cuarta llevan las fibras parasimpáticas a las vísceras pélvicas. Estas fibras parasimpáticas transcurren lateralmente para unirse a las fibras simpáticas a la altura del plexo pélvico, lateral y anterior a los bordes de las vesículas seminales en los hombres. Para preservar todas estas estructuras es capital una disección muy ajustada del mesorecto.



4-

Figura 2. Anatomía linfática y vascular del recto. Las flechas indican la posibilidad de diseminación tumoral vía linfática. Adaptación de (25)

1.1.2.2. Histología

La gran mayoría de los tumores de colon y recto son carcinomas. Otros tipos histológicos (neoplasias neuroendocrinas, hamartomas, tumores mesenquimales, linfomas) son relativamente inusuales. De los carcinomas, más del 90 por ciento son adenocarcinomas. La Organización mundial de la salud (OMS) es la entidad que establece la definición de los diferentes subtipos histológicos (**Tabla 1**).

Los marcadores inmunohistoquímicos más sensibles y específicos de diferenciación intestinal y extremadamente útiles para identificar correctamente los adenocarcinomas de origen colorrectal son la citoqueratina 20 (CK20) y la homeobox 2 de tipo caudal (CDX2)(26–28).

Tabla 1. Clasificación de los tumores de colon y recto de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (25,29).

Tumores epiteliales benignos y precursores
Displasia serrada de bajo grado
Displasia serrada de alto grado
Pólipo hiperplásico, tipo microvesicular
Pólipo hiperplásico, célula caliciforme
Pólipo adenomatoso, displasia de bajo grado
Pólipo adenomatoso, displasia de alto grado
Adenoma tubular de bajo grado
Adenoma tubular de alto grado
Adenoma vellosa de bajo grado
Adenoma vellosa de alto grado
Adenoma tubulovellosa de bajo grado
Adenoma tubulovellosa de alto grado
Adenoma avanzado
Neoplasia intraepitelial glandular de bajo grado
Neoplasia intraepitelial glandular de alto grado

Tumores epiteliales malignos
Adenocarcinoma NOS
Adenocarcinoma serrado
Adenocarcinoma de tipo adenoma
Adenocarcinoma micropapilar
Adenocarcinoma mucinoso
Carcinoma poco cohesivo
Carcinoma de células en anillo de sello

Adenocarcinoma medular
Carcinoma adenoescamoso
Carcinoma, indiferenciado, NEOM
Carcinoma con componente sarcomatoide
Tumor neuroendocrino NOS
Tumor neuroendocrino, grado 1
Tumor neuroendocrino, grado 2
Tumor neuroendocrino, grado 3
Tumor de células L
Tumor productor de péptidos similares al glucagón
Tumor productor de Polipéptido pancreático/ Péptido YY
Carcinoide de células enterocromafines
Tumor productor de serotonina
Carcinoma neuroendocrino NOS
Carcinoma neuroendocrino de células grandes
Carcinoma neuroendocrino de células pequeñas
Neoplasia mixta neuroendocrina y no neuroendocrina (MiNEN)

El grado de diferenciación histológica es otro de los factores fundamentales para definir la histología de este tipo de tumores. Tiene en cuenta la proporción de glándulas bien formadas, la inclusión de otras características citológicas en la estimación del grado es variable. La formación de glándulas está presente en mayor o menor grado en tumores bien diferenciados y moderadamente diferenciados (tumores de bajo grado cuando se usa un sistema de clasificación de dos niveles), respectivamente. Por el contrario, los adenocarcinomas poco diferenciados o indiferenciados (tumores de alto grado) no forman estructuras glandulares bien definidas, que consisten predominantemente en láminas sólidas o cordones de células infiltrantes, a menudo con marcada atipia celular, pleomorfismo y una alta tasa mitótica. En la mayoría de los estudios, la importancia pronóstica del grado se tiene en cuenta en el análisis

estadístico como una variable de estratificación de dos niveles: grado bajo (bien y moderadamente diferenciado) versus grado alto (pobremente diferenciado o indiferenciado)(30). El colegio americano de patólogos recomienda una gradación en 4 grados histológicos para una mejor estadificación histológica (**tabla 2**):

Tabla 2. Estadificación de grados histológicos descrita por el colegio americano de patólogos (25,29).

Grado 1	bien diferenciado (> 95 por ciento de formación de glándulas)
Grado 2	moderadamente diferenciado (50 a 95 por ciento de formación de glándulas)
Grado 3	poco diferenciado (<50 por ciento de formación de glándulas)
Grado 4	indiferenciado (sin formación de glándulas o mucina; sin diferenciación escamosa o neuroendocrina)

Sin embargo, en la edición más reciente (quinta) de la Clasificación de tumores del sistema digestivo de la OMS, se recomienda el uso de un sistema de dos niveles, definido por los tumores bien y moderadamente diferenciados o de bajo grado y pobremente diferenciado o de alto grado(31).

Muchos tumores producen mucina, que puede permanecer dentro de las células o ser secretada. La mucina extracelular puede facilitar la invasión del tumor a través de la pared del colon(32). Los tumores que producen grandes cantidades de mucina extracelular (es decir, mucina que comprende ≥ 50 por ciento de la masa tumoral) se clasifican como carcinomas mucinosos (**tabla 1**). Este tipo histológico representa aproximadamente del 11 al 17 por ciento de todos los tumores colorrectales(33–35). Los carcinomas mucinosos son más habituales en el colon derecho(36,37), y suelen presentar una mala respuesta a la quimio-radioterapia (QRT) neoadyuvante(38) y la quimioterapia adyuvante(39), aunque esta es un área algo controvertida con la presencia de neoplasias mucinosas del apéndice(40).

En algunos carcinomas no glandulares, la mucina intracelular puede ser una característica dominante que desplaza los núcleos de las células tumorales hacia un lado. Si una proporción superior al 50 por ciento del tumor la compone células de este tipo, se define como carcinoma de células en anillo de sello (**figura 3**). Representa sólo del 1 al 2 por ciento de todos los

carcinomas colorrectales, pero el carcinoma de células en anillo de sello es una variante agresiva con una propensión a la diseminación intramural extensa y la carcinomatosis peritoneal(32,41,42). Un estudio que evaluó a 1600 pacientes con cáncer colorrectal demostró que 13 de los 14 pacientes diagnosticados con un carcinoma de células en anillo de sello tenían enfermedad en estadio III o IV en el momento del diagnóstico y nueve tenían diseminación peritoneal(42). Es interesante destacar que el carcinoma de células en anillo de sello tiene una alta incidencia de inestabilidad de microsatélites y una fuerte asociación con el síndrome de Lynch.

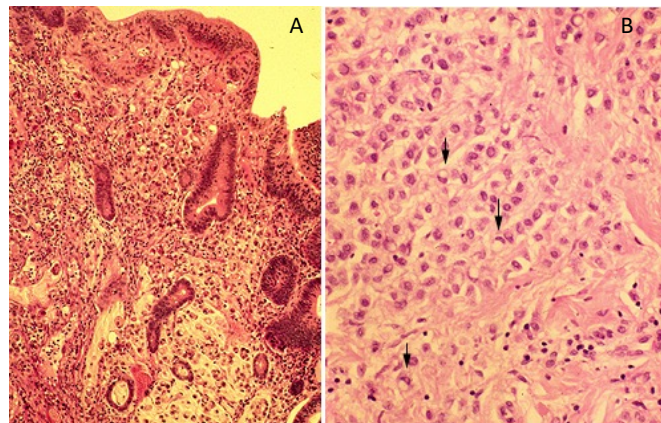


Figura 3. Lámina histológica con tinción de hematoxilina y eosina que muestra la ampliación de un carcinoma en anillo de sello dentro de un pólipo adenomatoso. A) vista de bajo aumento; B) vista de mayor aumento que muestra las típicas celdas de anillo de sello, que se identifican con flechas negras(25)

Algunos tumores, en particular los que surgen en el colon distal, contienen áreas de diferenciación escamosa, denominándose carcinomas adenoescamosos(43). Estos tumores raros representan entre el 0,05 y el 0,2 por ciento de todas las neoplasias malignas colorrectales y se asocian con una mayor mortalidad global y específica en comparación con el adenocarcinoma(44,45).

Aproximadamente el 10 por ciento de los tumores colorrectales, en particular los tumores poco diferenciados, contienen focos de diferenciación neuroendocrina. Los tumores no formadores de glándulas con predominio neuroendocrino se clasifican como tumores neuroendocrinos (carcinoides) bien diferenciados, con un pronóstico más favorable que los

adenocarcinomas, y como carcinomas neuroendocrinos poco diferenciados, que en general tienen un pronóstico desfavorable. Sin embargo, no está clara la importancia pronóstica de la diferenciación neuroendocrina focal dentro de otros tipos histológicos, como un adenocarcinoma. La evaluación de la diferenciación neuroendocrina debe realizarse en cortes rutinarios teñidos con hematoxilina y eosina; los datos son insuficientes para recomendar el uso de tinciones especiales como la cromogranina, la enolasa específica de neuronas o la sinaptofisina)(25).

El carcinoma medular es un tipo distintivo de tumor no formador de glándulas, compuesto por grandes células poligonales eosinofílicas que crecen en láminas sólidas y están muy infiltradas por linfocitos infiltrantes de tumores(31). Es importante el diagnóstico de este tipo de tumor debido a su asociación con tumores que son deficientes en una o más proteínas de la reparación, incluidos los que surgen en el contexto del síndrome de Lynch(46). Estos tumores tienen característicamente un alto grado de inestabilidad de microsatélites, frecuentemente en combinación con una mutación *BRAF*, y se asocian con un buen pronóstico. Los tumores del intestino grueso con inestabilidad de microsatélites son más frecuentes en el colon derecho; son más a menudo de tipo histológico mucinoso, en anillo de sello o medular; y tienen abundantes linfocitos que infiltran el tumor o están rodeados por una reacción linfoide productora de un centro germinal similar a la de Crohn.

1.1.2.3. Clasificación del cáncer de recto

La clasificación del cáncer de recto se basa en los hallazgos anatómo-patológicos. La clasificación actualmente vigente es la de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) en su octava edición de 2017 (TNM 8 edición 2017)(25,29). La clasificación TNM está representada en la tabla 3 y 4.

Es importante una buena localización y conocimiento de los ganglios regionales del recto:

- ganglios rectales superiores (hemorroidales) - medio e inferior (ubicados en la grasa del mesorrecto) o ganglios mesorrectales (sinónimo de ganglio rectal).
- ganglios linfáticos ilíacos internos (hipogástricos) (que son continuos con los ganglios linfáticos de la arteria medio rectal)

- ganglios sacros laterales - promontorio presacro y sacro (Gerota);
- ganglios linfáticos mesentéricos inferiores
- ganglios linfáticos inguinales si el canal anal está involucrado
- las metástasis en los ganglios linfáticos distintas de las enumeradas anteriormente se clasifican como metástasis a distancia (por ejemplo, obturador o ganglios linfáticos ilíacos externos). La disección de los ganglios ilíacos externos e internos (hipogástrico) no se recomienda porque aumenta las secuelas y no mejora no supervivencia después del tratamiento neoadyuvante(47).

Tabla 3. Octava edición de la clasificación TNM, publicada en 2017 (48).

<p>Tx</p> <p>T0</p> <p>Tis</p> <p>T1</p> <p>T2</p> <p>T3</p> <p>T4</p> <p>T4a</p> <p>T4b</p> <p>(48)</p>	<p>Información insuficiente para clasificar el tumor primario.</p> <p>Sin evidencia de tumor primario.</p> <p>Carcinoma <i>in situ</i>: intra-epitelial o que invade la lámina propia.*</p> <p>Tumor que invade la submucosa.</p> <p>Tumor que invade la muscular.</p> <p>Tumor que invade la subserosa o tejido perirrectal no peritoneal.</p> <p>Tumor que invade directamente otros órganos o estructuras y/o perfora el peritoneo visceral.</p> <p>Tumor que perfora el peritoneo visceral.</p> <p>Tumor que invade directamente otros órganos o estructuras.^{+,#}</p>
<p>Notas(49):</p> <p>* Tis incluye casos de células cancerosas situadas en la membrana basal glandular (intra-epitelial) o en la lámina propia (membranas intramucosas) sin extensión a través de la membrana mucosa hasta la submucosa.</p> <p>+ La invasión directa de un estadio T4b incluye la invasión de otros segmentos del colon o recto a través de la serosa, probado por examen microscópico o incluye, para tumores situados retro o subperitoneal, la extensión directa a otros órganos o estructuras debido a la extensión más allá de la mesorrecto y fascia rectos.</p> <p># Un tumor que se adhiere macroscópicamente a otros órganos o estructuras se clasificado cT4b. Sin embargo, si no hay células tumorales presentes en la zona de adhesión al examen microscópico se clasificará pT1-3, según la profundidad de inundación en la pared.</p>	

Nx	Información insuficiente para clasificar las adenopatías regionales.
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales.
N1a	Metástasis en 1 ganglio linfático regional.
N1b	Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales.
N1c	Nódulos tumorales, satélites* en la subserosa o en tejidos pericólicos o perirrectales no peritonizados sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N2	Metástasis en ≥ 4 ganglios linfáticos regionales.
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales.
N2b	Metástasis en ≥ 7 ganglios linfáticos regionales.
<p>Notas. * Los nódulos tumorales (satélites), macroscópicos o microscópicos, localizados en el tejido adiposo pericólico o perirrectal de la zona de drenaje linfático del tumor primario sin signo histológico de tejido linfático residual en el nódulo pueden corresponder a extensión tumoral discontinua, invasión venosa con extensión extravascular (V1/2) o un ganglio linfático totalmente tumoral (N1/2). Si tales nódulos se observan con tumores que se habrían clasificado como T1 o T2, entonces la clasificación T permanece sin cambios y el nódulo se registra como N1c. Si el patólogo considera que el nódulo es un ganglio linfático completamente destruido por el proceso tumoral (generalmente con un contorno regular), debe registrarse como un ganglio linfático positivo y no como un nódulo satélite, y cada uno de ellos debe contarse por separado para establecer la clasificación pN final.</p>	
M0	sin metástasis.
M1	presencia de metástasis a distancia.
M1a	Metástasis localizadas en un solo órgano (hígado, pulmón, ovario, ganglios linfáticos distintos de los regionales).
M1b	Metástasis en más de un órgano.
M1c	Metástasis en el peritoneo con o sin compromiso de otro.

Es necesario el examen de al menos 12 ganglios linfáticos regionales para la evaluación

correcta del estado de los ganglios linfáticos. Si no se alcanza este número, el patólogo debe volver a examinar la pieza. Sin embargo, en ausencia de invasión ganglionar, aunque no se alcance el número de 12 ganglios linfáticos examinados, el TNM 2017, la UICC (2002) y el AJCC recomiendan clasificar a los pacientes N0 y no Nx(48,50).

Es importante destacar que el número de ganglios linfáticos a menudo se reduce después del tratamiento neoadyuvante. Por lo tanto, es posible que no se logre la cantidad de 12 que normalmente se requieren a pesar de una búsqueda cuidadosa.

Tabla 4. Estadíos de enfermedad según la clasificación TNM 8 edición 2017(48).

Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1, T2	N0	M0
Stade II	T3, T4	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
Stade IIC	T4b	N0	M0
Stade III	todo T	N1, N2	M0
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stade IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stade IVA	Todos T	Todos N	M1a
Stade IVB	Todos T	Todos N	M1b
Stade IVC	Todos T	Todos N	M1c

Los datos del registro norte americano SEER muestran una relación compleja entre el grado de extensión de la pared y la afectación de los ganglios linfáticos. Por ejemplo, las lesiones pT2N1 presentan una mejor supervivencia global (SG) a los 5 años (72%) que las pT3N0 (64%)(51).

El examen patológico realizado debe especificar el estado del margen distal y el margen circunferencial de la resección, así como el grado de integridad macroscópica del mesorrecto según los criterios de Quirke(52). Un margen distal o circunferencial <1 mm se considera

invadido (resección R1). Un margen circunferencial a <2 mm predice una recaída local(53). Sin embargo, una resección R1 expone un mayor riesgo de metástasis que de recaída local(54). En el caso de tratamiento preoperatorio, el estadio TNM de la pieza operatoria se expresará en ypTNM (Ver sección 1.1.2.3).

1.1.2.4. Anatomía patológica

La regresión tumoral corresponde a la destrucción de células tumorales por tratamiento neoadyuvante. Sin embargo, es importante destacar que se trata de un factor completamente diferente de la evaluación para el estadiaje ypTNM. Se evalúa semicuantitativamente valorando el porcentaje de células viables y el porcentaje de territorios fibrosos o coloides resultantes de la destrucción del tumor. Podemos encontrar diferentes clasificaciones para describir la regresión tumoral, la más antigua y una de las más conocidas y utilizadas es la clasificación de Dworak(55). Estas clasificaciones describen de 3 a 5 grados que van desde la respuesta completa hasta la ausencia de respuesta. La regresión tumoral es un factor importante a tener en cuenta para los pacientes con cáncer de recto, ya que es un buen indicador de la radiosensibilidad y quimiosensibilidad del tumor y por tanto del pronóstico de los mismos. Se recomienda retirar un mínimo de 5 bloques del sitio del tumor y, para tumores que midan menos de 3 cm o si no hay tumor residual, incluir toda la lesión o tejido restante. Una respuesta histológica completa en el tumor primario se definirá por la ausencia de células tumorales viables y se asocia a muy buen pronóstico(56), aunque este parámetro de alto valor pronóstico no puede considerarse en la actualidad como un criterio subrogado(57).

En los informes de anatomía patológica se recomienda especificar, además del margen circunferencial y el estadio ypTNM, el grado de respuesta histológica. En el ensayo ACCORD 12, la puntuación Dworak modificada utilizada incluyó 4 grados (en lugar de 5 en la versión original de 1997), incluidos los dos grados más reproducibles, es decir, el grado 4: células viables no detectables; grado 3: unas pocas células viables detectables (que pueden encontrarse en el mesorrecto: ypT3 o la pared rectal: ypT1 o 2)(55,58).

Tabla 5. Clasificación de la respuesta histológica según los criterios de Dworak(55).

Grado 0	Sin regresión
Grado 1	Presencia dominante de la masa tumoral con objetividad de fibrosis y/o vasculopatía
Grado 2	Presencia dominante de cambios fibróticos con presencia de células tumorales o grupos de células tumorales fáciles de encontrar
Grado 3	Presencia de células tumorales microscópicas o muy difícil de encontrar entre el tejido fibrótico con o sin sustancia mucosa
Grado 4	Sin presencia de células tumorales, sólo tejido fibrótico en la masa (regresión o respuesta total)

Las clasificaciones actuales no tienen en cuenta los fenómenos de regresión que pueden afectar a ganglios linfáticos inicialmente metastásicos que pueden presentar regresiones parciales o totales. Esto podría reflejar el impacto de los tratamientos de inducción, pero aún no se ha validado con suficiente evidencia. En el adenocarcinoma de recto se pueden observar respuestas particulares a la terapia de inducción, como la respuesta coloide; estos son grupos de mucina que contienen células adenocarcinomas o que son acelulares. Este tipo de respuesta se observa en aproximadamente el 30% de los adenocarcinomas de recto tras el tratamiento neoadyuvante. Según el College of American Pathologists, una respuesta coloide acelular debe considerarse una respuesta histológica completa; esta respuesta coloide puede objetivarse en los ganglios linfáticos(59).

1.1.2.5. Bases moleculares

En la actualidad, el análisis del estatus molecular de los tumores es una práctica habitual y que es necesaria previa a la elección del tratamiento, debido a la inclusión de la terapia dirigida en el manejo de los tumores. La búsqueda de un déficit de la reparación del ADN (cuya consecuencia es la inestabilidad de microsátélites) puede llevarse a cabo tanto por biología molecular (búsqueda de inestabilidad de microsátélites o MSI) como por inmunohistoquímica (detección de proteínas hMLH1, hMSH2, hMSH6 y hPMS2), ambos métodos son a la vez complementarios y han sido muy bien correlacionados(60). Este déficit está relacionado con tumores de origen germinal como es el caso del síndrome de Lynch(61), sin embargo no todos los tumores que presentan una pérdida de expresión de proteínas o MSI se diagnostican en pacientes con estas alteraciones; estas anomalías pueden adquirirse con el

envejecimiento y luego se dice que son esporádicas. Es interesante destacar que se ha evidenciado incluso una mayor respuesta a tratamientos a base de anticuerpos contra proteínas de muerte programada y su ligando (PD-(L)1)(62). Cuando la inmunohistoquímica revela una pérdida de expresión aislada de la proteína MLH1 o acoplada a las proteínas MLH1 y PMS2, es necesario un análisis genético adicional en la muestra de tumor para buscar la mutación V600E del gen *BRAF* y la hipermetilación del promotor de el gen MLH1, que, si está presente, está a favor de la naturaleza esporádica del tumor.

La regresión del tumor observada después del tratamiento neoadyuvante puede interferir con la determinación del estado de MSI por biología molecular. Además, la extinción de la proteína MSH6 en inmunohistoquímica se puede observar después del tratamiento neoadyuvante, sin que exista inestabilidad de microsatélites en biología molecular.

Todos estos argumentos están a favor de realizar biopsias fijadas e incluidas en parafina desde la valoración inicial con ecoendoscopia, dedicadas a la patología molecular, aunque la inestabilidad de microsatélites (MSI o dMMR según sus siglas en inglés) es mucho más rara en cánceres de recto (1 a 3%) que en cáncer de colon(61). El estudio de las mutaciones de *RAS* y *BRAF* también será útil en la enfermedad metastásica(63). En caso de una respuesta histológica completa o importante, este estado puede determinarse en biopsias previas al tratamiento para evitar falsos negativos(60).

Por último, es importante comentar que la mayoría de los cánceres de recto se desarrollan a través de la vía de inestabilidad cromosómica (CIN). Aproximadamente el 13% son causados por una reparación deficiente (deficient mismatch repair, dMMR). Existe un componente hereditario reconocido, aunque es más importante en el cáncer de colon que en el de recto. Los trastornos más comunes son el síndrome de Lynch y la poliposis adenomatosa familiar. Por tanto, el asesoramiento genético es un componente fundamental del tratamiento, que impulsa la vigilancia y las posibles intervenciones para el paciente y los miembros de la familia afectados(20).

1.1.3. Cáncer de recto localmente avanzado (CRLA)

1.1.3.1. Tratamiento neoadyuvante del CRLA

El manejo del cáncer de recto es complejo, principalmente por la necesidad de integrar las diferentes modalidades de tratamiento como la cirugía, la radioterapia (RT) y la quimioterapia (QT), que requieren en muchas ocasiones una estrategia terapéutica conjunta con intención curativa.

A principios de la década de los setenta y ochenta, la tasa de recaídas locorregionales dentro de la pelvis era extremadamente elevada, en algunos casos por encima del 40%, lo que dio lugar a numerosos estudios clínicos a fin de evaluar el papel de la RT y la quimioterapia adyuvante con 5- fluorouracil (5FU) como tratamiento complementario a la cirugía, principalmente en el cáncer de recto estadios II y III(64). Desde entonces se ha intentado mejorar el control local de la enfermedad, tanto por lo que respecta a la intervención quirúrgica, con la práctica de la escisión total del mesorrecto (ETM), como al desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces para reducir tanto la recurrencia local como la diseminación a distancia mediante la combinación de tratamientos en forma neoadyuvante(65).

La ETM supuso el primer paso para reducir las recidivas locales a menos de un 5%. El objetivo del tratamiento neoadyuvante se basa en la mejora de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) minimizando la tasa de recidiva local y obteniendo al mismo tiempo un mejor perfil de toxicidad(64). No obstante, mientras que las tasas de recurrencia local del cáncer de recto se han reducido al 5-6% con el tratamiento trimodal(66), las tasas de recaída a distancia se mantienen altas, en torno al 25%(67). De hecho, actualmente las metástasis constituyen la principal causa de muerte, por lo que los nuevos estudios están evaluando el papel de las QT sistémicas en el contexto neoadyuvante para controlar la posible enfermedad metastásica y así reducir el ritmo de recurrencia a distancia(64,68–70). En este contexto es importante destacar el papel de biomarcadores que nos ayuden a diferenciar aquellos pacientes que no van a tener un buen control de la enfermedad de los que si lo tendrán, así como el alto riesgo de recidiva.

1.1.3.1.1. Radioterapia

La radioterapia preoperatoria es el tratamiento estándar en el cáncer de recto localmente avanzado. Se puede administrar siguiendo dos estrategias:

- A) SCRT (short course RT), que consiste en la administración de 25 Gy en 5 fracciones de 5 Gy (5×5) en días consecutivos(71–75)
- B) LCRT (long course RT), que combina la quimioterapia con la radioterapia en dosis de 50,4 Gy administrada en fraccionamiento convencional de 28 fracciones de 1,8 Gy.

Podemos destacar el Polish Trial, que tenía como objetivo principal demostrar que la estrategia LCRT permitía cirugías más conservadoras y favorecía la preservación de los esfínteres, sin embargo, se evidenció que no había diferencias en cuanto a preservación esfinteriana. El porcentaje de ypCRM+ (margen radial posquirúrgico afectado) fue superior en el grupo SCRT, 13% versus 4%, sin mostrar diferencias en SG, en SLE ni en control local. La toxicidad aguda fue superior en el grupo LCRT, pero la toxicidad tardía fue equivalente(76). Un metaanálisis estudió la evolución de los pacientes según la estrategia terapéutica, pero no mostró diferencias significativas en cuanto a recurrencia ni supervivencia(77).

El Trans Tasman Radiation Oncology Group realizó un estudio aleatorizado con 326 pacientes afectados de neoplasia de recto situada dentro de los 12 cm desde el margen anal y valorada con ecografía o RM como cT3. El objetivo del estudio era demostrar que el tratamiento LCRT protegía más de la recurrencia local que la SCRT. El downstaging patológico fue superior en el grupo LCRT, 45% versus 28% $p = 0,002$, y también fue superior el porcentaje de respuestas patológicas completas: 15% versus 1%. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias en SG, en SLE ni en toxicidad tardía grado 3-4(78). Rutten H et al., en un metaanálisis del Dutch Trial centrado en la evolución de los pacientes de más de 70 años, evidenció que la estrategia SCRT seguida de cirugía inmediata no solo no aumentaba la supervivencia de los pacientes de este grupo de edad avanzada, sino que contribuía a aumentar la mortalidad no debida al cáncer específica(79).

Por este motivo, diferir la cirugía puede ser una buena opción. El estudio Stockholm III Trial analizó el impacto de retrasar la cirugía después del tratamiento previo con RT comparando 3 grupos diferentes: SCRT seguida de cirugía en 1 semana (grupo 1), SCRT y cirugía a las 4-8 semanas. (grupo 2), LCRT y cirugía a las 4-8 semanas (grupo 3). No se evidenciaron diferencias en cuanto a complicaciones postoperatorias entre los tres grupos: 46,6%, 40% y

32%, respectivamente ($p=0,164$). No obstante, hay que destacar que los pacientes tratados con SCRT y cirugía diferida 11-17 días presentaron mayor toxicidad que el resto de pacientes ($p=0,036$), sugiriendo que es el esquema más tóxico(80). En un análisis secundario publicado en 2019 con una media de seguimiento de 5,7 años se valoró la respuesta al tratamiento neoadyuvante evidenciando que la pCR del grupo 2 fue del 10,4%, superior a la respuesta de los tumores de pacientes que siguieron la secuencia del grupo 3 (25×2 Gys) y de aquellos que no recibieron QT concomitante (grupo 1) que demostraron una pCR del 2,2%(81).

En 2016, Bujko e investigadores. publicaron un estudio aleatorizado fase 3 en el que se modificó la SCRT incorporando un intervalo de 6 semanas a la cirugía con la administración de 3 ciclos de QT tipo FOLFOX (ácido folínico, fluorouracilo y oxaliplatino) dentro de este intervalo. El porcentaje de recidiva local y sistémica fue equivalente al esquema SCRT clásico, pero el grupo tratado con el esquema SCRT modificado presentó una mejor SG a 3 años (73% en el grupo SCRT modificado vs 65% en el grupo LCRT, $p=0,046$)(82). El estudio RAPIDO presenta un diseño similar y compara LCRT vs SCRT con quimioterapia en el intervalo. Los resultados del análisis demostraron que la SCRT con QT es más tóxica que la LCRT(83). Los resultados del ensayo RAPIDO se mostraron a favor de la SCRT seguida de quimioterapia antes de la escisión total del mesorrecto en el cáncer de recto localmente avanzado de alto riesgo, los resultados a los cinco años demostraron menor tasa de recaídas locorregionales en comparación con el brazo comparador (hazard ratio 0,75, 95% CI 0,60-0,95; $p=0,019$)(84)

1.1.3.1.2. Quimioterapia

Históricamente, los ensayos clínicos han mostrado que la RT postoperatoria concomitante con QT con fluoropirimidinas (5 fluorouracilo [5FU] o capecitabina utilizadas como radiosensibilizadores) disminuye significativamente el porcentaje de recidiva local(85–91). Sin embargo, el German Rectal Cancer Trial definió el tratamiento neoadyuvante con QRT como el estándar en el tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado vigente en la actualidad(92,93). Este importante estudio demostró que, incluso con un seguimiento mediano de 134 meses (11 años), el tratamiento con QRT previo a la cirugía mejora la tasa

de recidivas locales cuando se compara con el tratamiento tras la resección (7.1% versus 10.1%, respectivamente; $p=0.04$). Estos resultados fueron apoyados por el estudio NSABP R-03, que señala una mejora estadísticamente significativa de la SLE a los 5 años (64.7% versus 53.4%, respectivamente; $p=0.01$) y una tendencia, aunque no significativa, a una mejor SG (74.5% versus 65.6%, respectivamente; $p=0.06$)(94). También hay que destacar que, en este último estudio, el tratamiento neoadyuvante consiguió un 15% de pCR y que ninguno de estos pacientes presentó una recaída(94). Un meta-análisis de 17 estudios diferentes que incluyó 3.105 pacientes demostró una disminución de las tasas de recidiva local por debajo del 6% en pacientes que recibieron tratamiento QRT neoadyuvante. Este mismo artículo muestra que aquellos pacientes que consiguen una pCR con el tratamiento neoadyuvante tendrán una mejor SLE (HR: 0.54, 95%IC 0.40-0.73)(56).

Se han desarrollado estudios de fase II y III que incorporan oxaliplatino, irinotecán, bevacizumab y cetuximab a las fluoropirimidinas que no han mostrado mejora en los resultados conseguidos con monoterapia(95,96), por lo que actualmente no se recomienda utilizar estos fármacos en neoadyuvancia concomitante con la radioterapia fuera de ensayos clínicos. Fernández-Martos et al. demostraron que el tratamiento con quimioterapia a base de capecitabina y oxaliplatino previo a la quimio- radioterapia, no reduce su eficacia(97–99) y mejora los resultados respecto a la quimioterapia adyuvante. Sin embargo, no aumenta la tasa de respuesta histológica completa ni reduce la tasa de desarrollo de metástasis(99). Otros estudios aleatorizados de fase II confirmaron la ausencia de un aumento en tasa de respuesta histológica completa con quimioterapia de tipo CAPOX (capecitabina, ácido folínico y oxaliplatino) o FOLFOX(100–102).

Recientemente, en el año 2020, se han publicado varios estudios fase II que han explorado un tratamiento neoadyuvante diferente al descrito con anterioridad, se ha denominado tratamiento neoadyuvante total (TNT). Podríamos destacar los resultados de 2 ensayos:

- El estudio aleatorizado PRODIGE 23(103) evaluó el beneficio del tratamiento neoadyuvante basado en una quimioterapia de inducción con FOLFIRINOX (5FU, ácido folínico, irinotecan y oxaliplatino) seguida de quimio- radioterapia CAP50 para adenocarcinomas de recto T3-4Nx a menos de 15 cm del margen anal, conocido como el TNT. En este estudio, se compararon 231 pacientes que recibieron dicho esquema

con 230 pacientes que recibieron terapia estándar con quimio- radioterapia CAP50. En ambos brazos, los pacientes recibieron terapia adyuvante obligatoria después de la cirugía con 6 ciclos de mFOLFOX6 (o 4 ciclos de capecitabina) para el brazo experimental y 12 ciclos de mFOLFOX6 (u 8 ciclos de capecitabina) para el brazo estándar. Los pacientes fueron operados 7 semanas después de finalizar su tratamiento neoadyuvante. Se demostró que este esquema terapéutico es un seguro, con toxicidades manejables. No hubo una gran tasa de abandono y su tolerancia o la calidad de vida en general fue buena, por lo que los resultados fueron incluso más favorables para el grupo experimental (aunque sin ser estadísticamente significativo, $p= 0,076$). La quimioterapia adyuvante se toleró mejor en el grupo experimental (toxicidad de grado 3-4: 44,4% vs 74,1, $p <0,001$; neuropatía periférica 11,7% vs 20,7%, $p = 0,033$), y la dosis acumulada media de oxaliplatino administrada fue mayor en el grupo experimental (808 mg/m² frente a 745 mg/m², $p= 0,009$). Hubo más cirugías no terapéuticas (descubrimiento intraoperatorio de metástasis múltiples o tumor irreseccable o resección R2) en el grupo estándar (3,7% vs 0%, $p= 0,007$). La tasa de respuesta completa (ypT0N0) fue significativamente superior en el grupo tratado con TNT (27,8% frente a 12,1%, $p <0,001$). Este grupo mostró un menor riesgo de SLE a los 3 años (75,7% vs 68,5%, HR: 0,69 [0,49-0,97], $p= 0,034$) y una mejora en la supervivencia libre de metástasis (78,8% vs 71,7%, HR: 0,64, $p= 0,017$). No hubo diferencias significativas en la tasa de recurrencia local (4,3% frente a 5,7%) ni en la SG a los 3 años (aunque cercana a la significación: 90,8% vs 87,7, HR: 0,65 [0,40-1,05], $p= 0,077$). En junio de 2023 se han presentado los datos actualizados del estudio tras 7 años, con un claro beneficio del brazo en investigación en SLE (67.6% frente a 62.5% del grupo comparador) y en SG (44.4 meses frente a 39.4 meses del grupo tratado con tratamiento estándar)(104). Debido a estos resultados, el tratamiento neoadyuvante con FOLFIRINOX y quimio- radioterapia de adenocarcinomas de recto T3-T4Nx está recomendado como opción terapéutica por las guías clínicas.

- El ensayo RAPIDO(84,105) también evaluó el TNT. En este ensayo aleatorizado, se incluyeron pacientes considerados de alto riesgo de recurrencia: adenocarcinomas. A menos de 16 cm desde el margen anal con al menos 1 factor de riesgo en la resonancia

magnética pélvica inicial entre los siguientes factores: cT4, invasión venosa extramural, cN2, CRM ≤ 1 mm, invasión de los ganglios linfáticos pélvicos laterales. Los pacientes fueron randomizados entre el grupo experimental (radioterapia corta de 5x5 Gy seguida de quimioterapia neoadyuvante con 6 ciclos de CAPOX o 9 ciclos de FOLFOX4 y luego cirugía 2 a 4 semanas después del último ciclo de quimioterapia, sin quimioterapia adyuvante) y el grupo de control (Quimio-radioterapia CAP50 seguida de cirugía después de 6 a 10 semanas de espera y luego quimioterapia opcional según el centro con 8 ciclos de CAPOX o 12 ciclos de FOLFOX4). La tolerancia general de ambos brazos fue similar ya que el 85% de los pacientes recibieron toda la quimioterapia en el grupo TNT frente al 90% en el grupo control, pero en el grupo control solo 187/441 pacientes (42,4%) recibieron quimioterapia. interrumpido por problemas de tolerancia en 69 pacientes (37%). Esto plantea la cuestión de la comparabilidad de ambos brazos. El criterio de valoración principal fue el fracaso del tratamiento relacionado con la enfermedad definido por la aparición de uno de los siguientes eventos: recidiva locorregional, metástasis a distancia, nuevo cáncer colorrectal, muerte relacionada con el tratamiento. La probabilidad de fracaso del tratamiento acumulada a 3 años fue significativamente menor en el grupo TNT (23,7% frente a 30,4%, HR = 0,75 [0,60-0,95], p= 0,019). Esto se relacionó principalmente con una disminución del riesgo acumulado de la aparición de metástasis a distancia a los 3 años en el grupo TNT (20,0% vs 26,8%, HR: 0,69 [0,54-0,90]; p= 0,0048). No hubo diferencia entre los 2 grupos en la tasa de recurrencia local (8% para el grupo TNT vs 6%, p = 0,12). También se observó una mayor tasa de respuesta patológica completa en el grupo TNT (28% frente a 14%, p <0,0001). La SG a los 3 años no se vio afectada por el brazo de tratamiento (89,1% para el grupo TNT frente al 88,8% para el grupo control, HR: 0,92 [0,67-1,25], p= 0,59). Es importante destacar las limitaciones de este estudio para interpretar los resultados con cautela debido: cambio de criterio de valoración y de hipótesis estadística durante el estudio, ausencia de relectura centralizada de las evaluaciones por resonancia magnética en el momento de la inclusión, el brazo de referencia no incluyó quimioterapia adyuvante en la mayoría de los centros.

- El grupo alemán realizó otro estudio fase 2 (el CAO/ARO/AIO-12) que evaluó la

TNT con una inducción con FOLFOX seguido de QRT con 5FU más oxaliplatino seguido de TME, o la estrategia inversa conocida como consolidación (QRT con 5FU y oxaliplatino seguido de consolidación con FOLFOX seguido de TME). La tasa de pCR fue mayor con el segundo esquema (25% frente a 17%)(106). Por lo tanto, se demostró que administrar quimioterapia en la ventana entre la finalización de la radiación y la cirugía podría ser la estrategia más beneficiosa. Además, el estudio PAN-EX, que seleccionó solo a pacientes con características de alto riesgo y reunió datos de dos ensayos de fase 2, destacó la viabilidad y los resultados favorables de la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con CRLA de alto riesgo(107).

- Además, aunque de forma retrospectiva, se pueden extraer algunas conclusiones relevantes del estudio llevado a cabo por el Memorial Sloan Kettering (MSK)(108). Analizaron datos de aproximadamente 300 pacientes con CRLA tratados con TNT en comparación con un número similar de pacientes tratados con QRT. Se detectó una mayor exposición a la quimioterapia en los pacientes de la cohorte de TNT en términos de dosis total, reducciones de dosis y número de ciclos planificados. La tasa de respuesta completa, que incluye tanto la pCR como la respuesta clínica completa (cCR) en pacientes no sometidos a cirugía, fue del 36% en la cohorte TNT en comparación con el 21% en la cohorte QRT.
- En junio de 2023 se han publicado los resultados del ensayo PROSPECT, en el que se compara si, dar QT exclusiva con esquema FOLFOX en régimen neoadyuvante (solo se podía añadir QRT previa a la cirugía si la respuesta había sido inferior al 20% o si el paciente había discontinuado la QT por toxicidad) frente al esquema de QRT estándar en esta población (cT2N1, cT3N0 o cT3N1 candidatos a cirugía). El estudio alcanzó su objetivo principal, se demostró que el brazo experimental no es inferior al estándar para SLE (HR para recurrencia de la enfermedad o muerte, 0.92; IC del 90.2%, 0.74-1.14; p=0.005 para no-inferioridad). La SLE a 5 años fue de 80.8% (IC del 95% 77.9-83.7) en el brazo tratado con FOLFOX y de 78.6% (IC del 95%, 75.4-81.8) para el grupo tratado con QRT. Cabe destacar que el 9.1% de los pacientes del brazo experimental recibió QRT preoperatoria el 1.4% QRT postoperatoria(109).
- Finalmente, una revisión sistemática evaluó los resultados oncológicos de la quimioterapia de inducción antes o después de la QRT preoperatoria en un total de

648 pacientes de diez estudios, la mayoría en fase 2. Se reportó una tasa de SLE y SG de más del 60% y 70%, respectivamente(110).

Hasta ahora, los únicos resultados de la fase 3 que han informado sobre un enfoque TNT se derivan del estudio Polish II. En este ensayo, los pacientes con tumores cT3-T4 fueron asignados al azar para recibir QRT de ciclo corto seguido de tres ciclos de FOLFOX4 o QRT a base de fluoropirimidina concomitante con oxaliplatino semanal. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en términos de supervivencia(82,111). Sin embargo, este estudio tiene algunas debilidades que limitan sus conclusiones, como la no utilización de la resonancia magnética para la selección de pacientes, el criterio de valoración principal (tasa de resección R0) y la enmienda del protocolo de 2012, que permitió la retirada de oxaliplatino a criterio de los investigadores.

En general, podemos concluir de estos estudios que los resultados observados hasta ahora no han demostrado claramente un impacto en la supervivencia libre de enfermedad ni en la SG y en algún caso sugieren un posible incremento en la tasa de respuestas completas patológicas porque se incrementan el tiempo hasta la cirugía y el número de ciclos de QT post-RT/QT(112). Lo que se ha observado claramente en todos los estudios es la mejor tolerancia de la QT preoperatoria comparada con la QT adyuvante, aunque todavía no hay datos disponibles a largo plazo ni resultados de estudios fase III con validez suficiente para poder recomendar este esquema de forma generalizada en todos los pacientes con cáncer de recto localmente avanzado, aunque las guías NCCN ya consideran la TNT como una opción válida de tratamiento desde la edición de 2015 y las guías ESMO, en la edición de 2017, no las discuten en profundidad (se limitan a no recomendar la QT neoadyuvante completa sin RT fuera de estudios, pero no discuten la TNT)(19,29).

La implementación de la TNT puede llegar a la discusión de la RT selectiva, o sea, no administrar RT a los pacientes con buena respuesta a la QT de inducción. En este sentido, el estudio fase III FOWARC que comparaba QT de inducción (FOLFOX) con o sin RT, demostró una tasa más baja de respuestas patológicas completas en los pacientes que no recibieron RT, aunque los pacientes tratados solo con QT presentaron un porcentaje similar de “downstaging” y una mejor tolerancia con menos complicaciones posquirúrgicas. La estrategia de RT selectiva se considera hoy en día como no estándar en las recomendaciones

de expertos para el global de pacientes con cáncer de recto y se aconseja tan solo dentro de estudios clínicos.

El enfoque neoadyuvante ha permitido establecer como un marcador de supervivencia libre de enfermedad subrogado el “downstaging” tumoral, cuya máxima expresión es la obtención de una remisión patológica completa (pCR) tras la cirugía, que según las series es de entre el 15 y el 27%. Otros beneficios, como por ejemplo la preservación de órganos, la probabilidad más baja de desarrollo de recurrencia local y la mejor SLE, también están ampliamente demostrados en la literatura(113–116).

Por otra parte, el 70% de los pacientes con cáncer de recto tienen más de 70 años, con un pico de incidencia entre los 80-85 años, pero estos pacientes están excluidos de los ensayos. Por consiguiente, la toma de decisiones sobre la estrategia terapéutica en personas de edad avanzada con cáncer de recto no está consolidada por la evidencia científica, sino que se sustenta en la extrapolación de las indicaciones terapéuticas de los pacientes jóvenes. Los datos reales evidencian incluso que no se trata a estos pacientes de edad avanzada con dosis o esquemas terapéuticos óptimos por razones de edad, sobre todo por miedo a la toxicidad(117,118). En este sentido, se han publicado algunos estudios que se centran en esta población. Como ejemplo podemos destacar los análisis publicados de la base europea EUROCORE-5, en este análisis se evidenció un incremento de la supervivencia de los pacientes afectos de cáncer entre los años 2005-2007 comparando con el intervalo de años 1999-2001 (57,6%-52,1%), sin embargo, el grupo de los pacientes de edad avanzada no se objetivó esta mejora(119). Hay estudios retrospectivos en este sentido que incluyen a pacientes con cáncer de recto en los que tras la administración de radioterapia y conseguir una respuesta completa se ha realizado vigilancia con una SG del 100% tanto a los 2 como a los 5 años y SLP alrededor del 90%(120–126).

1.1.3.1.3. Toxicidades

Todo tratamiento oncológico puede reportar efectos secundarios y toxicidades a los pacientes que aceptan someterse al mismo. En los tumores localmente avanzados debemos destacar aquellos efectos adversos derivados del tratamiento con quimioterapia y radioterapia y de los de la cirugía, también en relación según el tratamiento sistémico que elijamos.

Los efectos secundarios postoperatorios más frecuentes son infecciones de la pared, las fistulas anastomóticas y las obstrucciones gastrointestinales. En un metaanálisis publicado en 2017 se analizaron más de 40.000 pacientes(127), la radioterapia y la QRT preoperatoria aumentaron el riesgo de infección de la pared presentando una odd ratio (OR) de 1,43 (IC del 95% [1,17 - 1,74], $p < 0,01$) y OR: 1,52 (IC del 95% [1,08 - 2,16], $p = 0,02$) respectivamente. Solo la QRT preoperatoria pareció incrementar el riesgo de fístula anastomótica con una (OR: 1,22 (IC 95% [1,00 - 1,50], $p = 0,05$)), particularmente en el caso de cirugía abierta (OR: 1,25 (IC 95% [1,01 - 1,55], $p = 0,04$)), que sin embargo no se encontró después en el caso de cirugía laparoscópica a pesar de una OR similar de 1,3 (IC 95% [0,44 - 3,91], $p = 0,63$). No hubo un aumento estadísticamente significativo en el riesgo de obstrucción gastrointestinal después de la radioterapia y la QRT preoperatoria. El riesgo de mortalidad postoperatoria se incrementó en el caso de radioterapia preoperatoria con una OR de 1,60 (IC 95% [1,04 - 2,47], $p = 0,03$); sin embargo, un análisis de subgrupos revela que este aumento de riesgo solo afecta a pacientes mayores de 65 años (OR: 2,12 (IC del 95% [1,31 - 3,43], $p < 0,01$). Otros factores que influyeron de forma negativa en la mortalidad postoperatoria: un DEB < 35 y un régimen de “ciclo corto” de radioterapia corta (≤ 5 fracciones). Este aumento de la mortalidad postoperatoria también se encontró en el caso de QRT preoperatoria (OR: 1,65 (IC 95% [1,04 - 2,59], $p = 0,03$))(127).

Cabe señalar que, en el contexto de la QRT, el uso de fluoropirimidinas induce toxicidad digestiva grado ≥ 3 en el 10-40% de los pacientes, e incluso toxicidades letales excepcionalmente. El 5,3% de sus toxicidades de grado 3-4 parecen estar relacionadas con una deficiencia enzimática en la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)(128,129). Esto ha motivado una recomendación por parte de las agencias reguladoras, para detectar sistemáticamente la deficiencia de DPD mediante el análisis de uracilemia (fenotipado) antes de comenzar el tratamiento con 5-FU o capecitabina(130).

La radioterapia tiene un impacto negativo en las funciones sexuales y digestivas(131), siendo mayor el riesgo de impotencia, dispareunia e incontinencia anal con la radioterapia combinada con la cirugía. Sin embargo, este riesgo de aumento de la toxicidad es moderado si se utilizan pequeños volúmenes de irradiación(132) que no superen la línea S2-S3 y protejan el canal anal, especialmente para los cánceres del recto medio. En un estudio holandés, las recurrencias por encima de S3 fueron excepcionales para pacientes N0 con

resección en márgenes sanos(133). Este enfoque permite una reducción del volumen que recibe la pelvis a al menos 15 Gy (V15) en el intestino delgado en un 65% utilizando una técnica conformacional 3D, y una reducción de V15 en el intestino delgado en un 78% en la radioterapia conformacional con modulación de intensidad. Del mismo modo, Joye et al. sugieren reducir el límite superior del volumen irradiado al nivel de S1-S2 en pacientes N0 sin afectación de la fascia mesorrectal(134).

En el ensayo ACCORD 12, la frecuencia de toxicidades tardías de grado ≥ 3 fue inferior al 3% a los 5 años(135). Sin embargo, el grupo CAPOX 50 tuvo una función del esfínter más deficiente en comparación con el grupo CAP 45. La radioterapia de contacto combinada como un suplemento de dosis de la QRT no parece aumentar la toxicidad temprana o tardía del tratamiento(136,137). El estudio aleatorizado OPERA (NCT02505750) permitirá un análisis más preciso de la eficacia y toxicidad de la radioterapia además de la QRT(138).

1.1.3.2. Tratamiento adyuvante del CRLA

Actualmente, a pesar de la reducción del riesgo de recidiva local, el riesgo de recurrencia metastásica después de la extirpación del cáncer de recto se mantiene en el orden del 20% al 60%, según el estadio TNM inicial. En ensayos clínicos recientes este riesgo de tumores de recto T3 o T4 se mantuvo entre 32% y 38%(73,75,87,88,95,139).

1.1.3.2.1. Quimioterapia con 5-FU en monoterapia

Pocos de los estudios históricos aleatorizados han demostrado el beneficio de la quimioterapia adyuvante con 5-FU y ácido folínico en el cáncer de recto. Existen argumentos en la literatura a favor de la quimioterapia adyuvante con fluoropirimidinas, pero, debido a la extensión de los estudios a lo largo de varios años, la heterogeneidad de los pacientes incluidos, la cirugía realizada (resección o no del mesorrecto), de los protocolos de QRT y quimioterapia adyuvante utilizados, un seguimiento deficiente, cualquier conclusión con altos niveles de evidencia es imposible. Los datos históricos publicados antes de 1990 de quimioterapia adyuvante, los metaanálisis de ensayos de quimioterapia adyuvante(140) y especialmente el estudio como QUASAR(141) sugieren, sin embargo, que la quimioterapia adyuvante con fluoropirimidinas (5-FU intravenoso o capecitabina), disminuye el riesgo de recurrencia metastásica y mejora la supervivencia después de la cirugía curativa para el cáncer de recto en estadio II o III, incluso después de la RT preoperatoria; un beneficio que

es similar al observado en el cáncer de colon.

Un metaanálisis realizado por la Cochrane en 2012 analizó 21 ensayos aleatorizados (incluidos 11 ensayos occidentales y 10 ensayos japoneses) publicados entre 1981 y 2011 con un total de 16 215 tumores colorrectales, incluidos 9 785 tumores rectales(140). Todos los estudios incluían una un esquema de quimioterapia basado en fluoropirimidinas en el brazo de tratamiento adyuvante. En 20 de estos estudios, los pacientes no recibieron terapia neoadyuvante. En términos de SG, la quimioterapia adyuvante redujo significativamente el riesgo relativo de muerte en un 17% en comparación con el seguimiento simple (HR = 0,83; IC del 95%: 0,76-0,91), pero con heterogeneidad entre los estudios ($p = 0,09$ para un riesgo alfa establecido en 10%). El riesgo de recurrencia local o a distancia también se redujo en un 25% (HR = 0,75; IC del 95%: 0,68-0,83) pero también con heterogeneidad en los resultados de los diferentes estudios ($p = 0,03$) lo que no permitió una conclusión clara(140).

El estudio 22921 de la EORTC no mostró una mejora en la SG de los pacientes que recibieron, después de la radioterapia preoperatoria o quimiorradioterapia seguida de cirugía, 4 ciclos de quimioterapia adyuvante con 5-FU y ácido folínico. En este ensayo, solo el 43% de los pacientes recibió toda la quimioterapia prevista por el protocolo y el 28% de los pacientes nunca inició la quimioterapia adyuvante(88), siendo frecuentes las dificultades de adherencia para las estrategias postoperatorias. Con un seguimiento de 10 años, la quimioterapia adyuvante no proporcionó ninguna ganancia en la SG o en el tiempo sin recidivas(88).

Breugom y colaboradores realizaron un metaanálisis que engloba 4 estudios, incluido el de la EORTC(142). Reunió los datos individuales de 1 196 pacientes con tumores localizados a menos de 15 cm del margen anal, clasificados como estadios II-III y operados con resección completa tras recibir radioterapia o quimiorradioterapia neoadyuvante, con o sin quimioterapia adyuvante postoperatoria con fluoropirimidinas. Con una mediana de seguimiento de 7 años, la quimioterapia adyuvante no permitió aumentar la SG (HR = 0,97; IC del 95%: 0,81-1,17; $p = 0,77$) ni la supervivencia libre de recidiva (SLR) (HR = 0,91; IC del 95%: 0,77-1,07; $p = 0,23$). No hubo diferencias para la SLR a 5 años con o sin quimioterapia (35,5% frente a 36,5%, $p = 0,523$). Sin embargo, en el análisis de subgrupos, los autores demostraron un beneficio del tratamiento adyuvante en pacientes con un tumor

ubicado entre 10 y 15 cm del margen anal (recto superior) con respecto al tiempo libre de recidiva local (HR = 0,59; IC 95%: 0,40-0,85; p = 0,005) y a distancia (HR = 0,61; IC 95%: 0,40-0,94; p = 0,025). Sin embargo, la metodología de este estudio ha sido bastante controvertida y discutida(143,144). Solo se incluyeron pacientes con cáncer de recto ypTNM en estadio II y III, los pacientes en estadio I o con una respuesta histológica completa fueron excluidos del análisis. Por tanto, se excluyeron los pacientes más sensibles a los QRT y se incluyeron en este análisis los pacientes más resistentes. Cabe destacar la baja adherencia a la quimioterapia postoperatoria con solo el 48 al 73% de los pacientes que recibieron la quimioterapia adyuvante planificada(142).

1.1.3.2.2. Quimioterapia con 5FU y oxaliplatino

Los ensayos MOSAIC y C07 de la NASBP fueron los que establecieron los estándares del tratamiento con quimioterapia para el cáncer de colon(145,146). Estos estudios permitieron la inclusión de tumores de recto situados en el tercio superior (a 12 o 15 cm del margen anal) sin radioterapia preoperatoria. Otros ensayos aleatorizados también han investigado el beneficio de agregar oxaliplatino a una fluoropirimidina(147,148).

El ensayo fase II coreano ADORE (Adjuvant Oxaliplatin in Rectal cancer) incluyó 321 pacientes con estadios II y III, incluido un 20% de pacientes mayores de 65 años. Todos los pacientes presentaban una resección completa (TME después de QRT). Se comparó un tratamiento postoperatorio de 4 meses con 5-FU + ácido folínico a FOLFOX-6 modificado (o FOLFOX 4s, con oxaliplatino a 85 mg /m²). La SLR a los 3 años fue significativamente mayor en el grupo de FOLFOX-6m (72% vs 63%, p = 0,047) y esto se confirmó a los 6 años(149). La SG a los 3 años fue mayor en el grupo de FOLFOX 6m en la primera publicación de los datos de 3 años, pero no fue mayor a los 6 años que la observada con 5FU-ácido folínico. En el análisis de subgrupos, el beneficio relativo de FOLFOX-6m en términos de SLR fue mayor y fue significativo solo para los estadios III: 67% vs 57% (HR 0,60; IC del 95%: 0,37-0,98; p = 0,04). En el subgrupo de pacientes ypN2, FOLFOX mejoró la SG (HR = 0,42; IC del 95%: 0,18-0,96; p = 0,004) pero en un número reducido de pacientes (n = 63)(149). Otro estudio asiático (FORWARC) incluyó 495 pacientes y no demostró superioridad de FOLFOX durante la radioterapia y tras la cirugía en comparación con la combinación sin oxaliplatino y radioterapia preoperatoria, con continuación de 5-FU y ácido

folínico tras la resección tumoral(150).

Finalmente, dos ensayos de fase III, CAO/ARO/AIO-04 y PETACC-6, evaluaron la adición de oxaliplatino a la quimioterapia neoadyuvante y la quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de recto cT3-T4 o cN+ M0. El criterio de valoración principal en estos 2 ensayos fue el SLR a los 3 años. Los pacientes fueron intervenidos con TME y la duración de la quimioterapia adyuvante fue de 4 meses.

- El estudio CAO/ARO/AIO-04 incluyó a 1 265 pacientes entre 2006 y 2010 y evaluó 5-FU (continuo durante la QRT, bolus en periodo postoperatorio) versus un régimen con oxaliplatino durante el QRT seguido de FOLFOX-6 después de la resección durante 4 meses (100 mg/m² de oxaliplatino). El 80% de los pacientes recibió tratamiento postoperatorio. En el grupo de FOLFOX-6, la SLR a los 3 años fue significativamente mayor que en el grupo de 5-FU (76% frente a 71%, HR = 0,79; p = 0,03). Las curvas de SG fueron idénticas(147).
- El estudio PETACC-6 (Pan European Trial Adjuvant Colon Cancer) incluyó a 1 094 pacientes y utilizó capecitabina sola o en combinación con oxaliplatino (XELOX) durante 6 ciclos. En el análisis intermedio con una mediana de seguimiento de 31 meses, los pacientes del grupo de capecitabina tuvieron una SLR a 3 años similar a la de los pacientes del grupo de XELOX (75% vs 74% p = 0,78; HR = 1,04; 95% CI: 0,81-1,33). En el subgrupo de pacientes con ypTxN+ en la pieza operatoria (n = 283), los resultados no fueron mejores (IC del 95%: 0,67-1,42). Los resultados finales a más de 5 años no han mostrado una diferencia para ypN+ como para ypN-, en la tasa de recurrencia a los 5 años (criterio de valoración principal del estudio) y la SG (148).

En total de 4 estudios que asocian 5-FU intravenoso con oxaliplatino, dos de los cuales son de fase III, solo dos son positivos en SLR, sin beneficio en SG. El estudio que añadía capecitabina fue así mismo negativo. Por lo tanto, no queda claro el beneficio de añadir oxaliplatino a 5-FU en estos pacientes.

1.1.3.2.3. Caso especial de pacientes con respuesta completa tras QRT

Ningún estudio hasta la fecha ha concluido claramente sobre el beneficio de la quimioterapia adyuvante para pacientes con una respuesta completa después de la QRT. En 2015, Maas et

al. en un análisis agrupado de 13 estudios en los que participaron más de 3300 pacientes, no se encontró ningún impacto de la quimioterapia adyuvante para el subgrupo de pacientes en respuesta completa después de la QRT (290 pacientes con quimioterapia frente a 608 pacientes sin quimioterapia)(151). Posteriormente, un análisis de cohorte estadounidense de 2764 pacientes en respuesta completa después de la QRT comparó 741 pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante y 741 pacientes sin adyuvancia, el estudio encontró un impacto favorable del tratamiento adyuvante en la SG (HR = 0,50; 95% IC: 0,32-0,79; p = 0,005) (supervivencia a 5 años: 94,7% con quimioterapia vs 88,4% sin quimioterapia, p = 0,005), especialmente para los pacientes que al diagnóstico fueron clasificados como cT3/T4N+(152). Por lo tanto, no queda muy claro el papel del tratamiento adyuvante en esta subpoblación, ya que ambos estudios fueron realizados de forma retrospectiva y las conclusiones no pueden ser determinantes.

1.1.3.3. Cirugía de los tumores de recto localmente avanzado

1.1.3.3.1. Evaluación inicial previa a la cirugía

La resección completa tumoral es el factor pronóstico más importante para los tumores de recto. Lo primero que debemos tener en cuenta a la hora de planificar una posible cirugía para los pacientes de cáncer de recto es la operabilidad del paciente, es decir, el estado físico y fisiológico basado en la edad y una correcta evaluación geriátrica en su caso, el sexo y la morfología, balance funcional y escala de la sociedad americana de anestesia (ASA).

Uno de los exámenes fundamentales previo a la resección es la cromoendoscopia, es el más eficaz para diferenciar las lesiones superficiales (intramucosas o submucosas <1000 micrones) de las lesiones invasivas profundas (> 1000 micrones). Para lesiones superficiales (Sano IIIa, Kudo VI), se recomienda la escisión local endoscópica o quirúrgica por vía transanal baja y permitirá confirmar la invasión mediante el análisis histológico de la pieza de resección. Por el contrario, en el caso de un tumor invasivo profundo (Sano IIIB, NICE III, KUDO VN), una evaluación endoscópica y de resonancia magnética permitirá predecir el estadio parietal y la extensión ganglionar. En el caso de una lesión invasiva profunda accesible al dedo (tumores de los tercios inferior y medio del recto), el tacto rectal realizado por un médico experto, proporciona información sobre las posibilidades de resección de la

lesión. En mujeres, se complementa con una evaluación de la vagina. El gold-standard para evaluar la resecabilidad es la resonancia magnética (RM) pélvica, que muestra con precisión la invasión de la fascia del recto, el espacio interesfinter y / o los órganos perirectales.

Un tumor se considera clínicamente irreseccable o en riesgo de resección R1 (factor de mal pronóstico) si está adherido a un órgano o estructura vecinos en el tacto rectal y radiológicamente si el margen circunferencial es <1 mm en la RM. La no resecabilidad, R1 (probable residuo microscópico) o R2 (probable residuo macroscópico), puede variar según la respuesta al tratamiento neoadyuvante. La figura 4 muestra imágenes con ejemplos de resonancias magnéticas de pacientes con diagnóstico de cáncer de recto localmente avanzado con características de alto riesgo. Es fundamental que el cirujano examine al paciente antes del inicio de la terapia neoadyuvante para poder evaluar la respuesta del tumor más tarde, generalmente de 6 a 8 semanas después del final de la RT. Por lo tanto, puede juzgar mejor la resecabilidad del tumor y las posibilidades de conservación del esfínter, o incluso del recto.

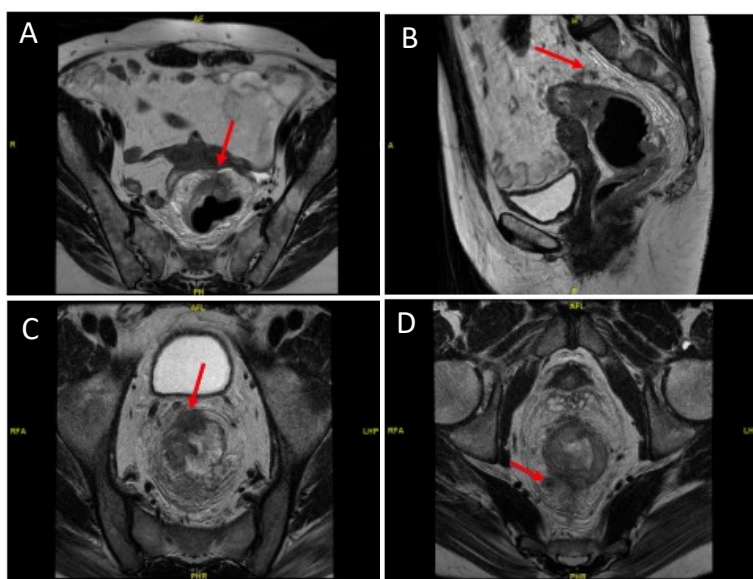


Figura 4. Ejemplos de resonancias magnéticas de pacientes que muestran cáncer de recto localmente avanzado con características de alto riesgo. (A) Cáncer de recto de tercio superior con invasión peritoneal (cT4a). (B) Mismo paciente que muestra invasión vascular extramural. (C) Cáncer de tercio recto inferior en un varón con invasión de la parte anterior de la fascia mesorrectal (cT3d) y múltiples ganglios linfáticos peritumorales de gran tamaño (N2) (D). Adaptada de Papaccio et al. *Cancers* 2020, 12, 3611(153).

Es importante cuantificar el grado de respuesta clínica. En el ensayo ACCORD 12, la respuesta completa se definió según el resultado del tacto rectal y de la proctoscopia rígida como: sin tumor visible, pared rectal flexible o cicatriz o ulceración residual leve(58,95). Esta respuesta clínica completa se correlacionó con la obtención de la pieza quirúrgica, la ausencia de recaída local y la SLE(95). La respuesta completa fue poco habitual en tumores T3 de más de 4 cm de diámetro. Estrategias de vigilancia sin cirugía(154,155) o con escisión transanal local(156,157) ante una respuesta clínica completa o casi completa han sido estudiados en diferentes ensayos clínicos o en situaciones individualizadas, en particular en personas mayores o frágiles o que se niegan a una amputación abdominoperineal. La resonancia magnética es útil, pero aún se está evaluando, para evaluar esta respuesta tumoral. Permite cuantificar la respuesta según la puntuación TRG (Tumor Regression Grade). Una puntuación ymrTRG1 o 2 indica una respuesta completa o casi completa a la resonancia magnética de control después del tratamiento neoadyuvante(158–160).

1.1.3.3.2. Métodos quirúrgicos

La resección del recto (proctectomía) se realiza después de una evaluación completa de la cavidad abdominal. Se recomienda una biopsia de cualquier lesión sospechosa para orientar el tratamiento posterior. El descubrimiento durante el acto quirúrgico de una carcinomatosis peritoneal debe hacer renunciar a la cirugía. Se debe valorar el envío del paciente a un centro experto en el tratamiento de carcinomatosis peritoneal tras de una descripción precisa de las lesiones (distribución de las lesiones e índice de carcinomatosis peritoneal (ICP) de Sugarbaker)(161).

La escisión extrafascial del mesorrecto reduce significativamente la recurrencia locorregional y el respeto por la inervación pélvica limita las secuelas urinarias y sexuales de las resecciones rectales(162). En ausencia de afectación de la fascia del recto, la preservación de los nervios autónomos pélvicos mejora los resultados genitourinarios. Las lesiones más frecuentes ocurren en el plexo hipogástrico inferior.

En el caso de tumores del tercio superior, la sección del mesorrecto debe superar los 5 cm por debajo del límite inferior del tumor. Se recomienda reseccionar todo el mesorrecto de los

tumores de los tercios medio e inferior(52). La medición de los márgenes quirúrgicos (distal y circunferencial) es fundamental para definir la integridad de la resección y tiene papel pronóstico. El margen de seguridad distal (distancia entre el polo inferior del tumor y la intersección distal del recto) debe ser ≥ 1 cm, distancia medida en una pieza no fijada(163). Sin embargo, un margen <1 cm, después del tratamiento neoadyuvante, podría ser compatible con un buen control local(164). El valor del margen circunferencial sigue siendo un factor pronóstico independiente en términos de recurrencia y supervivencia después de una cirugía óptima con o sin quimiorradioterapia neoadyuvante(164).

La disección de los ganglios linfáticos mesentéricos inferiores está justificada sin involucrar la arteria mesentérica inferior en contacto con la aorta en todas las ocasiones. Una ligadura a 1 cm de la aorta da resultados comparables y evita los nervios pélvicos situados a este nivel. La sección de la arteria mesentérica inferior arriba o abajo de la aorta no afecta a la tasa complicaciones postquirúrgicas como las fístulas, al número de ganglios linfáticos extirpados o a la tasa de supervivencia a los 5 años(165,166). No se recomienda la disección de los ganglios linfáticos ilíacos(47). En caso de sospecha de un ganglio linfático en alguna de estas áreas, está recomendado tomar una muestra para examen extemporáneo con la colocación de un clip para su posterior identificación.

1.1.3.3.3. Tipos de escisión quirúrgica de los tumores no superficiales de recto

Los factores esenciales para la elección de la técnica quirúrgica adecuada son: la extensión locorregional del tumor, el margen lateral en la resonancia magnética y la morfología del paciente. Está recomendado el manejo quirúrgico de estos tumores en centros expertos(167). El objetivo principal del tratamiento mediante una resección anterior baja será la preservación del esfínter.

- Tumores de recto superior: resección del recto y mesorrecto hasta 5 cm por debajo del polo inferior

de la lesión, anastomosis colorrectal mecánica o manual más o menos protegida.

- Tumores de recto medio: escisión completa del mesorrecto, restauración de la continuidad mediante anastomosis colo-anal protegida. Se realiza un reservorio colónico de 5 a 6 cm de longitud J y si no es viable una anastomosis latero-terminal(168).

- Tumores de recto inferior: escisión completa de recto y mesorrecto. Se recomienda un margen distal macroscópico de al menos 1 cm y un margen lateral supramilimétrico inmediatamente o después de la disección interesfínter: se realizará una anastomosis coloanal protegida con reservorio colónico. Si el tumor invade el músculo estriado (esfínter externo o elevador) o si no se puede obtener un margen supramilimétrico con los músculos estriados se realizará una amputación abdominoperineal. Esta técnica también está indicada cuando la función anal previa a la cirugía no es óptima o en la recurrencia tumoral local. En 2013, Rullier y colaboradores describieron una clasificación de los tumores del recto inferior que permite evaluar las posibilidades de conservación del esfínter(169).

Clasificación de Rullier (**figura 5**):

- **Tipo I:** tumores supra anales a >1 cm del esfínter (tratamiento conservador posible con anastomosis coloanal)
- **Tipo II:** tumores yuxta-anales a <1 cm del esfínter (tratamiento conservador posible con resección interesfínter parcial)
- **Tipo III:** tumores intraanales: invasión del esfínter interno (tratamiento conservador posible con resección interesfínter total)
- **Tipo IV:** tumores transanales: afectación del esfínter externo (no es posible el tratamiento conservador, amputación abdominoperineal)

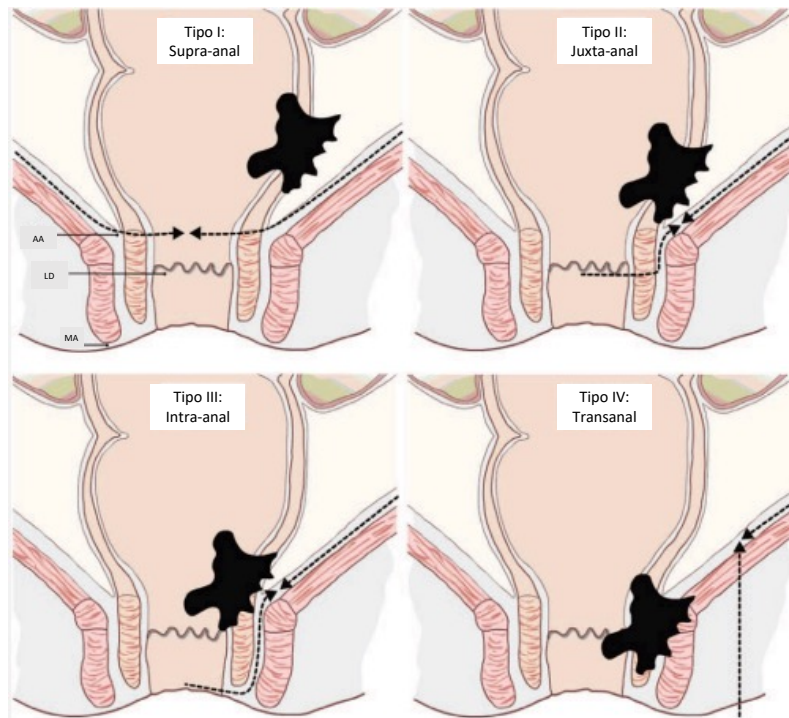


Figura 5. Clasificación de Rullier et al.(169). AA = anillo anal (borde superior del esfínter), LD = línea dentada (línea pectinada); MA = margen anal. Las líneas punteadas representan el plano de disección quirúrgica.

1.1.3.4. Factores pronósticos del CRLA

Son diversos los estudios que han demostrado cuales son los factores pronósticos más importantes en los tumores de colon y de recto. El factor pronóstico más importante tras la resección de los tumores colorrectales es el estadio patológico en el momento de la presentación(25). La figura 6 muestra la supervivencia a cinco años estratificada según el estadio tumoral en el momento del diagnóstico del cáncer de recto según los criterios de estadificación del American Joint Committee on Cancer.

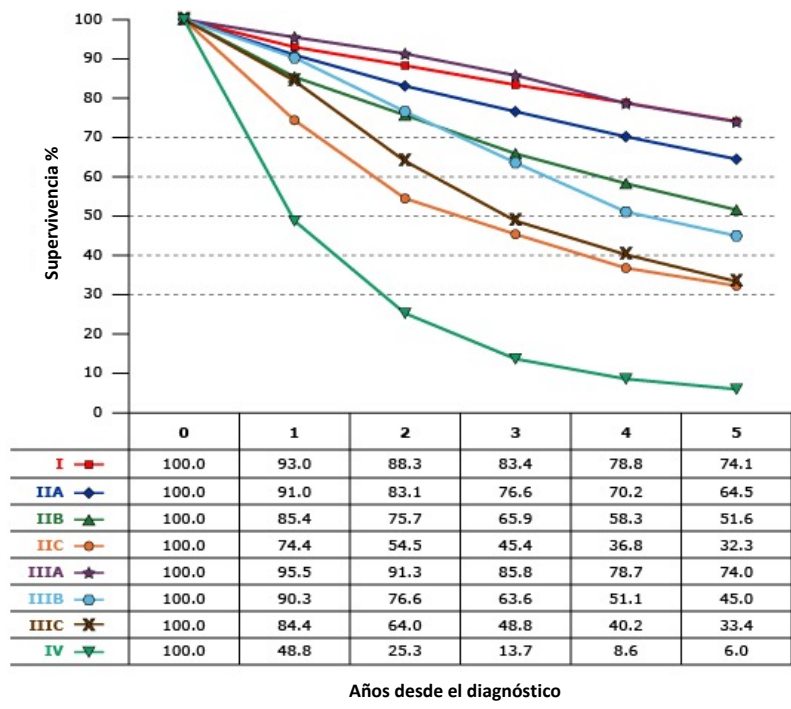


Figura 6. Tasas de supervivencia observadas para 9860 pacientes con adenocarcinoma de recto(25).

Para aquellos pacientes con cáncer de recto que van a recibir o han recibido tratamiento neoadyuvante con QRT, la estadificación patológica, designada como ypTNM en la clasificación de la AJCC, será un factor pronóstico más preciso que el estadio clínico previo al diagnóstico (**Tabla 5**).

Tabla 6. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 y 10 años según el estadio patológico posterior al tratamiento (yp) y el grado de regresión tumoral (TRG) hallados en la resección después de la quimiorradioterapia neoadyuvante en el ensayo del German Rectal Cancer Study Group (CAO/ARO/AIO-94).

Categoría yp	SLE a 5 años (%)	SLE a 10 años (%)
ypT		
T0	86	90
T1	95	95
T2	81	78
T3	65	66
T4	42	40
ypN		
N0	85	84
N1	65	59
N2	18	28
TRG		
4	86	90
2-3	75	74
0-1	63	63

Sin embargo, más allá del estadio patológico hay otros determinantes pronósticos para los tumores colorrectales, como son la invasión tumoral extramurales, la invasión renovascular y peri neural, el grado de diferenciación histológica, el nivel preoperatorio de antígeno carcinoembrionario (ACE) sérico, la inestabilidad de microsatélites (MSI) y las mutaciones *RAS* y *BRAF*. Los factores descritos en la literatura actual se desarrollan a continuación:

1.1.3.4.1. Factores patológicos

1.1.3.4.1.1. Extensión local del tumor

La extensión local del tumor ha demostrado ser un factor pronóstico independiente para supervivencia(170–172). Uno de los factores importantes a la hora de definir el estadio patológico es la afectación de la serosa. La determinación histológica de la invasión de la serosa es difícil y una interpretación conservadora puede conducir a una subestimación de la enfermedad. Como ejemplo, el examen citológico de cortes serosos revela células malignas en hasta el 26% de las muestras de definidas como histológicamente pT3(171). El Manual de estadificación de la AJCC recomienda el corte a varios niveles y/o el envío de láminas adicionales de tejido para evaluar la afectación serosa por extensión directa del tumor o por inflamación, cualquiera de los cuales se clasifica como T4a(25). La importancia pronóstica

de la proximidad tumoral a menos de 1 mm de la superficie serosa sin penetrar en la serosa no está clara, sin embargo, estos pacientes tienen un mayor riesgo de recaída peritoneal(173).

Los hallazgos histopatológicos asociados a una afectación peritoneal del tumor son heterogéneos; la afectación peritoneal local puede reflejarse en cualquiera de las siguientes formas(171):

- Una reacción mesotelial inflamatoria y/o hiperplásica con el tumor próximo de la superficie serosa.
- Presencia de tumor en la superficie serosa con una reacción inflamatoria, hiperplasia mesotelial y/o erosión o ulceración.
- La presencia de células tumorales libres en la superficie serosa dentro del peritoneo con ulceración subyacente del peritoneo visceral.

Los tres tipos de afectación peritoneal local pueden utilizarse para definir la afectación serosa (es decir, tumores T4a(174)), y todos repercuten negativamente en el pronóstico(46,171). La presencia de células libres en la superficie serosa es más probable que las otras dos formas como muestra de la afectación peritoneal para predecir la recurrencia y/o persistencia intraperitoneal(171). En los casos en los que la afectación peritoneal es dudosa, suele asignarse la categoría menor (es decir, T3)(175). Aquellas porciones del colon y recto que no están en contacto con el peritoneo (porciones posteriores del colon ascendente y descendente, porción inferior del recto), la categoría T4a no es aplicable.

Entre los factores que se han estudiado y se ha determinado que no tienen un impacto significativo en el pronóstico de estos tumores se encuentran el tamaño tumoral(170,176,177) y la configuración macroscópica del tumor(177,178). Sin embargo, algunos estudios publicados en los últimos 10 años sugieren que el tamaño tumoral podría ser un factor de mal pronóstico para los tumores de colon, pero no para el cáncer rectal(179). En general, los tumores de más de 4,5 cm demostraron ser un valor predictor independiente de mal pronóstico; sin embargo, el punto de corte óptimo del tamaño indicativo de mal pronóstico fue diferente según la ubicación anatómica en el colon, disminuyendo de derecha a izquierda(179).

1.1.3.4.1.2. Tumor residual tras la resección

El tumor residual tras un tratamiento radical es un factor de mal pronóstico(46,174,180,181). A modo de ejemplo, en un estudio que incluyó 152 pacientes diagnosticados con tumor de colon T4, la SLE a 10 años fue significativamente menor para los 42 pacientes con tumores resecados de forma incompleta en comparación con aquellos con una resección completa T4N0 o T4 con afectación de ganglios linfáticos (19% frente a 88% y 58%, respectivamente)(181).

La integridad de la resección depende en gran medida del estado del margen de resección circunferencial (radial), aunque la designación es global e incluye los márgenes transversales y otras afectaciones observadas no eliminadas en la cirugía(174).

La designación R hace referencia a la enfermedad residual local tras el tratamiento y se aplica solo en el contexto de la enfermedad no metastásica (**tabla 7**)(25).

Tabla 7. Definición de la calidad de resección quirúrgica de estadios no metastásicos (25).

R0	indica la resección completa del tumor con todos los márgenes sin afectación histológica
R1	resección tumoral incompleta con afectación de los márgenes de resección quirúrgica microscópica (márgenes muy poco afectados)
R2	resección tumoral incompleta con tumor residual macroscópico que no se resecó (tumor primario, ganglios regionales o compromiso del margen macroscópico)

Se ha propuesto una clasificación R ampliada que tiene en cuenta la distancia mínima entre el tumor y el margen de resección(182). Sin embargo, estas modificaciones a la clasificación R aún no han sido adoptadas por el AJCC, y no forman parte de la edición de 2010 ni de la edición de 2017 del manual de estadificación TNM(174).

1.1.3.4.1.3. Radio circunferencial del margen

El margen de resección circunferencial corresponde a la superficie de la muestra quirúrgica que no está en contacto con el peritoneo. Se aplica a cualquier parte del colon y del recto que

no esté cubierto (o parcialmente cubierto, como en el colon ascendente y descendente y el rectosigmoide) por una capa serosa de células mesoteliales y que deba disecarse del retroperitoneo. En los tumores de recto medio y distal, que son completamente subperitoneales, toda la superficie externa de la muestra se considera un margen de resección circunferencial.

En el cáncer de recto, la calidad de la técnica quirúrgica y el estado del margen de resección circunferencial es uno de los factores predictivos más importantes de la recidiva local y a distancia, así como de supervivencia(183–188). La escisión mesorrectal total con una resección quirúrgica adecuada alrededor del borde por el que infiltra el tumor disminuye la tasa de recaída local. Con este método, todos los tejidos blandos mesorrectales que recubren el recto (que incluye el mesenterio y todos los ganglios regionales) se eliminan intactos y la superficie circunferencial es la fascia mesorrectal. Las pautas para clasificar la calidad y la integridad del mesorrecto en una escisión mesorrectal total se describen en la tabla 8(189).

Tabla 8. Clasificación de la calidad y la integridad del mesorrecto en una escisión mesorrectal total(189).

	Mesorrecto	Defecto	Cono	margen circunferencial
Completa	intacto, liso	no más profundo de 5 mm	ninguno	regular, lisa
Casi completa	grosor moderado, irregular	muscularis propia no visible	moderado	irregular
Incompleta	pequeño grosor	por debajo de la muscularis propia	moderado/marcado	irregular

En el análisis de la pieza quirúrgica, se debe medir y registrar la distancia entre el borde de resección más cercano del tumor y el margen circunferencial, en mm, sea positivo o no(190). Hay evidencia de que el riesgo de recurrencia local y de muerte aumenta si la distancia entre el punto de infiltración tumoral y el margen es ≤ 1 mm(183,191). En los tumores de recto, un margen positivo define enfermedad T3 con resección R1 o R2 (es decir, compromiso microscópico o macroscópico del margen por tumor) (**figura 7**). Por lo tanto, el College of American Pathologists (CAP) recomienda registrar un CRM como positivo si el tumor se

identifica a 1 mm o menos de la superficie de la pieza quirúrgica que no está en contacto con el peritoneo. Para los pacientes que no han recibido radioterapia previa a la cirugía, la positividad del margen será una indicación tratamiento adyuvante, independientemente de la extensión del tumor local, para los tumores de recto(192).

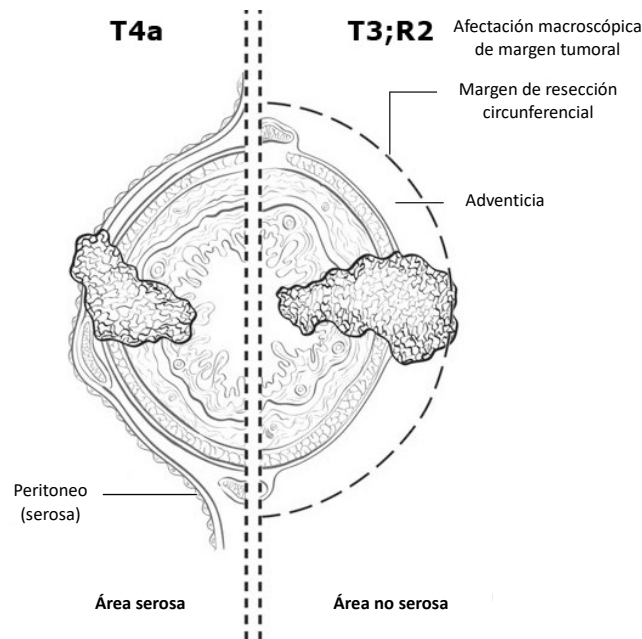


Figura 7. Representación gráfica de la estadificación de los tumores de recto. Aquellas regiones que no se encuentran en contacto con el peritoneo no tendrán una denominación pT4a, como es el caso de los tumores de recto inferior. Adaptada de (25).

1.1.3.4.1.4. Ganglios linfáticos regionales

La afectación de los ganglios linfáticos regionales es uno de los predictores más fuertes de supervivencia después de la resección quirúrgica del tumor, solo superado por la presencia de metástasis a distancia. La diseminación tumoral a los ganglios linfáticos es una indicación para la realización de terapia adyuvante tanto para el cáncer de colon como para el cáncer de recto, ya que reduce el riesgo de metástasis a distancia. Como dato interesante, hay algunos estudios que sugieren que las metástasis linfáticas y a distancia tienen su origen en subclones tumorales independientes(193,194).

La incidencia de afectación de los ganglios linfáticos regionales en los cánceres de colon y recto está relacionada tanto con la profundidad de la invasión transmural del tumor primario como con el grado histológico. El número de ganglios linfáticos afectados es un fuerte factor pronóstico(50,195–197); como resultado, la clasificación TNM estratifica la afectación ganglionar según el número de ganglios linfáticos afectados. Además del número de ganglios afectados, el número total de ganglios linfáticos en la muestra quirúrgica influye directamente en el pronóstico de la enfermedad en estadio II (ganglios negativos) y en estadio III (ganglios positivos)(198–200)

Además, se ha sugerido el uso de la ratio de ganglios linfáticos (la proporción de ganglios linfáticos afectados entre los examinados) como forma de evaluar ambos factores en la estratificación pronóstica(201,202). Una revisión sistemática de 16 estudios incluyó 33 984 pacientes con tumores de recto o colon en estadio III, concluyendo que dicha ratio era un predictor independiente de la SG, del tiempo libre de enfermedad y de la supervivencia específica del cáncer. En el estudio el valor pronóstico del índice fue superior al número de ganglios positivos(201). Sin embargo, no hay consenso claro en cuanto a los valores de corte óptimos. Además, no hay ensayos prospectivos que aborden esta cuestión y los valores utilizados en los análisis retrospectivos realizados varían ampliamente(201).

Un mayor número de ganglios resecados refleja la calidad de la cirugía y de la resección completa. Las guías de grupos de expertos recomiendan que se examinen histológicamente al menos 12 ganglios(29,192). Se ha cuestionado la relevancia del umbral de 12 ganglios para los pacientes con cáncer de recto que han recibido terapia neoadyuvante antes de la resección. La extirpación de 12 o más ganglios a menudo no se puede lograr después de la terapia neoadyuvante, y los recuentos ganglionares más bajos en este contexto no asocian con una sub-estadificación o una menor supervivencia(203).

1.1.3.4.1.5. Invasión micronodular

Existe controversia en cuanto a la importancia pronóstica de la presencia de células tumorales aisladas o micrometástasis en los ganglios regionales(204). En la clasificación de estadificación TNM actual de 2010, no se consideran como enfermedad ganglionar positiva, aunque la presencia de células aisladas, ya sea detectada mediante técnicas histológicas

estándar o por inmunohistoquímica, se codifica como pN0 (i +), y un tumor que es detectado solo por las técnicas moleculares especiales, como la RT-PCR, se codifican como pN0 (mol +)(174).

1.1.3.4.1.6. Invasión extramural

La presencia de estos depósitos tumorales es un factor de mal pronóstico importante(205). La influencia adversa sobre el pronóstico se observa tanto en pacientes con(206,207) como sin metástasis ganglionares (208). La presencia de depósitos tumorales extraganglionares extramurales está estrechamente relacionada con la presencia de invasión venosa extramural(208).

1.1.3.4.1.7. Regresión tumoral tras el tratamiento preoperatorio

En pacientes con cáncer de recto seleccionados adecuadamente, la QRT neoadyuvante se asocia con una respuesta tumoral significativa y una regresión tumoral(209). Para estos pacientes, el pronóstico viene determinado por el estadiaje patológico de la pieza quirúrgica. La erradicación del tumor en estos pacientes, detectada mediante el examen patológico de la muestra resecada, se asocia con un pronóstico significativamente mejor en comparación con los pacientes con tumor residual, en particular con enfermedad ganglionar residual(210). De forma similar, la enfermedad mínima residual se asocia con un mejor pronóstico que la enfermedad residual macroscópica(211).

1.1.3.4.1.8. Invasión renovascular

La invasión tumoral de las venas o de pequeños vasos no musculados es un determinante pronóstico importante(178,212–214). Tanto la invasión venosa, en particular de las venas extramurales, como la invasión linfática representan factores pronósticos adversos independientes(46,176,212).

Dada su importancia pronóstica, es uno de los factores clínico-patológicos que se incluye en la definición de cáncer de colon en estadio II de "alto riesgo" de la Sociedad Americana de

Oncología Clínica (ASCO)(215), Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN)(29) y Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO)(216). La presencia de estas características de alto riesgo influye en la decisión del uso de quimioterapia adyuvante.

1.1.3.4.1.9. Invasión peri neural

La invasión peri neural se asocia con un mal pronóstico de forma independiente en el análisis multivariado(217–219). Dada su importancia pronóstica, es otro de los factores clínico-patológicos incluidos en la definición de cáncer de colon en estadio II de "alto riesgo".

1.1.3.4.1.10. Tipo histológico, grado de diferenciación y presencia de mucina

Como regla general, el tipo histológico no ha demostrado ser un factor pronóstico independiente para los adenocarcinomas colorrectales, con la excepción de algunos subtipos de alto grado (por ejemplo, tumores en anillo de sello, mal diferenciados o indiferenciados)(33). Sin embargo, el grado histológico es una característica que se ha demostrado sistemáticamente que es un factor pronóstico independiente del estadio(172,220).

1.1.3.4.1.11. Reborde tumoral

La configuración del tumor en el borde tumoral tiene un significado pronóstico que es independiente del estadio. En concreto, un patrón de crecimiento infiltrante irregular en oposición a un borde de liso ha demostrado ser un factor pronóstico adverso independiente en varios estudios multivariados(221,222).

1.1.3.4.1.12. Otros factores pronósticos Respuesta inmune del paciente

Además de los factores de mal pronóstico principales, podemos destacar otros no específicos de este tipo de tumores, pero que se han estudiado también en diferentes investigaciones. Como en muchos otros tipos de cáncer, la presencia de linfocitos que infiltran el tumor es un factor pronóstico favorable en la mayoría de los estudios(223,224). En particular, una alta

densidad de células T CD8 + y células CD45RO + (tanto linfocitos CD4 + como CD8 + que han estado expuestos al antígeno, es decir, células de memoria) dentro de estas poblaciones linfoides se ha asociado con la ausencia de evidencia patológica de invasión metastásica temprana, estadio precoz y mejor en la supervivencia del paciente (223,224). Sin embargo, a pesar de estos datos, en la actualidad, la respuesta inmune del huésped aún no se considera un indicador de pronóstico estándar para uso clínico.

Otros factores que podrían influir en el pronóstico de los pacientes son la. Fibrosis peritumoral(171), la densidad de la microcirculación(46) o el hallazgo de una diferenciación focal neuroendocrina(225). Por último, la localización del tumor a lo largo del colon se ha demostrado que es un factor pronóstico para los tumores de colon, pero no ha sido estudiado en recto(226).

1.1.3.4.2. Factores clínicos

Además de los factores patológicos hay ciertos parámetros clínicos que se han demostrado como indicativos pronósticos.

1.1.3.4.2.1. Niveles de Antígeno carcinoembrionario (CEA) preoperatorio

En la mayoría de los estudios, pero no en todos(227)), niveles altos preoperatorios de CEA han demostrado tener importancia pronóstica. Sin embargo, no hay tanta evidencia sobre el punto de corte óptimo, aunque niveles de CEA $\geq 5,0$ ng/ml es el más aceptado para un impacto adverso en la supervivencia independientemente del estadio tumoral(172,228–230). Los pacientes con CEA preoperatorio elevado, a pesar de no presentar otros factores de mal pronóstico como la positividad de los ganglios, podrían considerarse con un riesgo de recidiva superior tras la cirugía y esto podría influir en la decisión de tratar con quimioterapia adyuvante, especialmente si existen otros factores clínicos. de riesgo como la obstrucción intestinal o la perforación. Sin embargo, no hay evidencia científica suficiente que apoye el uso de un tratamiento adyuvante en esta población.

1.1.3.4.2.2. Obstrucción o perforación intestinal

Hay diversos estudios que apoyan un impacto pronóstico negativo de la obstrucción intestinal

como presentación clínica en el momento del diagnóstico de los tumores de colon y recto(231,232). Además, también se ha observado que la perforación macroscópica es una característica de mal pronóstico(233,234). Aunque muchos de estos estudios indican que la obstrucción y/o la perforación fueron factores predictivos independientes de una peor supervivencia en el análisis multivariado, algunos han concluido que los tumores colorectales que precisan de cirugía de emergencia debido a estos eventos generalmente muestran un perfil histopatológico más agresivo que los tumores en los que la cirugía es electiva(235).

1.1.3.4.2.3. Factores moleculares

Hay una amplia variedad de marcadores moleculares que se han estudiado como factores pronósticos o predictivos del cáncer de colon y recto; sin embargo, hasta la fecha el único factor con valor en la decisión terapéutica es la deficiencia del sistema de la reparación(236,237). Además, estos pacientes presentan una probabilidad elevada de presentar un síndrome de Lynch(61). Otro marcador se utiliza por su capacidad predictiva (las mutaciones del gen *RAS* predicen la falta de eficacia de los anticuerpos que se dirigen contra el *EGFR*), de hecho, los pacientes afectos de un carcinoma colorrectal deben ser estudiados del gen *RAS*, incluidos los codones 12 y 13 de *KRAS* y *NRAS* del exón 2; 59 y 61 del exón 3; y 117 y 146 del exón 4 para considerar una terapia dirigida(238,239). Por último, hay un tercer marcador (alteraciones del gen *BRAF*) que ha demostrado ser un factor pronóstico y predictivo(27,240).

1.1.3.5. Factores predictivos de cáncer colorrectal

Existe una amplia variedad de marcadores moleculares aplicables clínicamente que se han estudiado durante los últimos 10-15 años en los tumores colorectales. Hasta la fecha, hay tan solo tres factores que han demostrado un valor predictivo en el tratamiento del cáncer de colon y cáncer rectal.

La deficiencia de genes del sistema de la reparación

MMR según sus siglas en inglés, puede afectar a la toma de decisiones en la práctica clínica. Se debe solicitar el estado de MMR para la estratificación del pronóstico y la identificación

de aquellos pacientes con alto riesgo de presentar un síndrome de Lynch. Las mutaciones en uno de varios genes del MMR se ha demostrado en el síndrome de Lynch y en el 15 al 20 por ciento de los tumores esporádicos de colon(241). Los tumores deficientes en el MMR se caracterizan por un alto número de errores de replicación del ADN y altos niveles de inestabilidad de microsatélites (MSI), definido como inestabilidad en ≥ 30 por ciento de los loci de microsatélites(242). El término MSI se refiere a la expansión o acortamiento de las secuencias de ADN cortas que se repiten y que son causadas por la inserción o eliminación de unidades repetidas. La mayor parte de los estudios realizados hasta fecha sugieren que hay un menor beneficio de la quimioterapia adyuvante basada en fluorouracilo en aquellos pacientes con tumores que presentan una alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H). Es interesante resaltar que los pacientes con déficit del MMR asociados a síndrome de Lynch presentan un mayor número de mutaciones somáticas y de neoantígenos en comparación con los tumores esporádicos con dicha alteración, este hecho se asocia a una reacción inmunitaria más fuerte y una mejor SG(243).

Mutación del gen RAS

La activación de la cascada de señalización de EGFR es una vía bien descrita que conduce a la tumorigénesis del colon. Las mutaciones de los oncogenes *RAS* y *BRAF*, ubicados más abajo en la misma vía conducen a la activación de la misma, incluso cuando el EGFR está bloqueado. Por lo tanto, los tumores que presentan mutaciones de *KRAS* y *NRAS* no responden a la terapia anti-EGFR(244).

Las mutaciones de *KRAS* que involucran el codón 12 o 13 pueden identificarse en el 12 al 75 por ciento de los tumores y se han asociado de forma independiente con un peor pronóstico(245,246). Aunque menos frecuente y menos estudiado, las mutaciones de *NRAS* también se asocian con un peor pronóstico(238).

Los pacientes con carcinoma colorrectal que se consideren para una terapia anti-EGFR deben tener realizado un test de las mutaciones de *RAS*, incluidos los codones 12 y 13 de *KRAS* y *NRAS* del exón 2; 59 y 61 del exón 3; y 117 y 146 del exón 4.

Mutación de BRAF

Un tercer marcador que tiene una utilidad como factor pronóstico y predictivo es la mutación de *BRAF*. El análisis mutacional de *BRAF* V600E debe realizarse en tumores dMMR con pérdida de MLH1 para evaluar el riesgo de síndrome de Lynch(247). La presencia de una mutación *BRAF* favorece fuertemente un tumor esporádico, pero la ausencia de una mutación *BRAF* no excluye el riesgo de síndrome de Lynch. Las mutaciones que activan BRAF, la mayoría de las cuales ocurren en el codón 600 (V600E), ocurren en menos del 10 por ciento de los tumores colorectales esporádicos (especialmente asociadas al tabaquismo) y son un marcador pronóstico negativo para tumores localizados y metastásicos. No hay suficiente evidencia para recomendar el uso del estado mutacional de *BRAF* c.1799p.V600 como biomarcador molecular predictivo de la respuesta a los inhibidores anti-EGFR, pero si está a favor de que estos tumores son más resistentes a esta terapia(248,249).

Por último, cabe destacar que ha sido propuesta una clasificación molecular para los tumores colorectales basada en las características moleculares y el pronóstico de los mismos(250):

- CMS1 (similar a MSI): contiene la mayoría de los tumores con alta inestabilidad de microsatélites, con mutaciones en genes que codifican proteínas de la reparación del ADN, lo que genera una alta carga mutacional. El subtipo similar a MSI también está enriquecido para tumores con un fenotipo con alta presencia de metilaciones de grupos CpG y mutaciones en el oncogén *BRAF*.
- CMS2 (canónico): subtipo con alta inestabilidad cromosómica y activación de las vías Wnt y MYC.
- CMS3 (metabólico): enriquecido en tumores con mutaciones de *KRAS* y alteración de las vías metabólicas.
- CMS4 (mesenquimatoso): fenotipo mesenquimatoso y, con frecuencia, presencia de fenotipo metilador.

1.1.3.6. Seguimiento

La monitorización de los pacientes con tumores de recto localmente avanzado tiene como objetivo el tratamiento de una posible recidiva local mediante la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia si hay presencia de enfermedad a distancia tras la progresión de la enfermedad.

En global, según los consensos de expertos para la práctica clínica la monitorización debería comprender:

- Examen clínico cada 3 meses durante 3 años y luego cada 6 meses durante 2 años
- Ecografía abdominopélvica cada 3 meses durante 3 años y luego cada 6 meses durante 2 años
- Prueba radiológica de tórax cada 6 meses durante 3 años y luego anualmente durante 2 años
- Actualmente no se recomienda el seguimiento mediante marcadores tumorales como el ACE dados los resultados de estudios como PRODIGE(251). En caso de elevación preoperatoria, su normalización debe valorarse mediante un control a realizar en 6 u 8 semanas después de la cirugía. Su elevación persistente indica la persistencia de un residuo tumoral que requiere una evaluación morfológica más profunda.

Los elementos de vigilancia enumerados anteriormente se aplican a los tumores de colon en estadio II y III. El ritmo de monitorización se puede ajustar en la dirección de espaciar los intervalos de monitorización cada 6 meses en caso de estadio II con bajo riesgo de recurrencia.

La colonoscopia se recomienda:

- En caso de antecedentes personales de cáncer colorrectal tratados mediante escisión endoscópica o quirúrgica: si es incompleta o de mala calidad antes de la operación, la colonoscopia debe realizarse dentro de los 6 meses postoperatorios, luego al año, a los 3 años y a los 5 años, si la colonoscopia previa es normal.
- si es completa y de buena calidad preoperatoriamente, debe realizarse al año, a los 3 años y a los 5 años, si la colonoscopia previa es normal.

Esta vigilancia endoscópica se aplica a los tumores de recto independientemente de su estadio (I, II y III). El riesgo de recurrencia entre los 5 y los 10 años es bajo, pero no nulo, del 7% al 10%(252,253). Sin embargo, no hay evidencia de que prolongar el seguimiento más allá de los 5 años mejore el pronóstico del paciente.

1.2. ARNs no codificantes

1.2.1. Generalidades de los ARNs no codificantes

El genoma humano o material genético, conocido a nivel químico como ADN (ácido desoxirribonucleico), presenta un componente nuclear que se distribuye en 23 cromosomas y un componente mitocondrial que se repite en cada una de las mitocondrias celulares. La información genética de cada individuo es idéntica en cada una de las células que lo componen, sin embargo, la expresión en proteínas que dará lugar a las diferentes funciones del organismo va a diferir según la expresión o no de dicho material genético(254). En la década de los 70, Francis Crick's estableció el "dogma central" de la genómica al describir que la información genética está expresada en proteínas a través del ARN (ácido ribonucleico)(255). Los ARN son pequeñas copias de ciertas partes del ADN que transportarán la información genética desde la cadena de ADN tras su transcripción (ARN mensajero o mRNA). Sin embargo, únicamente el 1-2% del ADN va a traducirse en proteínas, la unidad funcional de las células, a través del ARN transferente o tRNA. Estas regiones que acaban derivando en diferentes proteínas se denominan regiones codificantes, y su conjunto se conoce como exoma(256). Se estima que el exoma está compuesto por unos 21.000 genes diferentes(257). El 98% del genoma restante lo compone el material no codificante, una parte del cual codifica otros tipos de ARNs con función reguladora como los microRNAs (miRNA) o los *small nucleolar ARN* (snRNA) que tienen otro tipo de funciones que no requiere su traducción en proteínas(255,258,259).

Durante los últimos 10 años se ha podido investigar de manera más profunda sobre la porción no codificante del ADN, llegando a la conclusión de que no solo participa de manera importante en los procesos fisiológicos como el crecimiento y el desarrollo celular o el funcionamiento de los órganos, sino que tiene un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades, sobre todo del cancer(260). En concreto, los ARN no codificantes (ncRNA) juegan un papel central en la codificación, descodificación, regulación y expresión de los genes, así como en la interacción de unos genes con otros(261). La expresión desregulada de ncRNA y los procesos de señalización subsecuentes de las vías moleculares, están implicados directamente en el desarrollo y la progresión del cáncer. Un buen ejemplo es probablemente la delección de 13q14.3 en la leucemia linfocítica crónica (LLC) que elimina los supresores

tumorales miR-15/16(262). Además de diferentes mecanismos genéticos, puede producirse una regulación al alza o a la baja de la expresión de ncRNA asociada con el cáncer a través de procesos epigenéticos, transcripcionales o postranscripcionales(260,261,263).

Los ncRNA se pueden dividir en diferentes clases, en general según su tamaño sea superior o inferior a 200 nucleótidos. Los ncRNA de pequeño tamaño (formados por menos de 200 nucleótidos) más importantes en cáncer incluyen los miRNA, tsRNA (*transfer RNA [tRNA]-derived small RNAs*) y piRNA (piwiARNs). En el extremo opuesto del espectro de tamaños se encuentran los lncRNA (ARN no codificantes de cadena larga o *long non-coding RNA*), que se caracterizan por ser ARN no traducidos de más de 200 nucleótidos de longitud e incluyen subclases como los pseudogenes y los ARN circulantes (cicRNA). En este trabajo nos centraremos en dos clases de ARN no codificantes sobre los que hemos realizados los experimentos que han dado lugar a las publicaciones presentadas en esta tesis doctoral: miRNA y lncRNA, en concreto el lincRNA-p21.

1.2.2. *MiARNs (miRNAs)*

1.2.2.1. Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs son ARNs de cadena simple de unos 22 nucleótidos de longitud que se generan de los transcritos endógenos de lazos hairpin (*hairpin-shaped transcripts*)(264). Se trata de pequeñas cadenas de ARN con un papel regulador que se describieron por primera vez mientras se estudiaba la caracterización de los genes que controlan el momento del desarrollo larvario en el gusano *Caenorhabditis elegans*; los experimentos revelaron dos pequeños ARN reguladores, lin-4 y, posteriormente, let-7(265,266). Los homólogos de let-7 fueron reconocidos pronto en otros animales, incluidos los mamíferos, que exhibieron una expresión temporal similar a la observada en *C. elegans*, este hallazgo sugirió que let-7 y quizás otros ARN temporales de cadena pequeña podrían estar desempeñando papeles ortólogos en diversos linajes de metazoos(267). Poco después, se informó que los ARN lin-4 y let-7 representaban un tipo de pequeños ARN endógenos que se encuentran en diferentes especies, algunos expresados de manera temporal, que se denominaron miRNAs(268,269). Desde entonces, se han encontrado miRNAs en plantas, algas verdes, virus y animales(270).

El proceso biológico para generar un miRNA maduro consta de múltiples pasos, desde un

gen que codifica miRNA y varias enzimas que juegan un papel muy importante en el proceso (figura 8 y 9). Primero, los genes de miRNA se transcriben a miRNA primarios (pri-miRNA). Este proceso es realizado por la enzima polimerasa II (pol-II)(271). Generalmente, los genes de miRNA existen en cualquier ubicación del genoma, incluidos intrones y exones. Sin embargo, la mayoría de estos genes codificantes de miRNAs que se han caracterizado están ubicados en el espacio intergénico entre dos genes codificantes de proteínas y tienen una dirección de transcripción diferente a los genes codificantes vecinos. Esto nos sugiere que los genes de miRNA pueden transcribirse de manera independientes. Sin embargo, hay alguna evidencia que indica que los miRNA pueden transcribirse junto con genes codificantes(272). Después de que pol-II transcriba los miRNA, el extremo 5' con la caperuza del pri-miRNA y el extremo 3' poliadenilado forman una estructura secundaria específica en forma de horquilla (hairpin-shaped stem-loop) y entra en un gran complejo llamado complejo de microprocesador (cuyo tamaño es de unos 500-650 kDa) que compone un complejo con la proteína Drosha (una endonucleasa de ARNasa III) y un cofactor esencial DGCR8/Pasha (una proteína que contiene dos ARN de doble cadena que unen dominios)(273–275). En este nuevo complejo, DGCR8 primero reconoce las distintas estructuras del bucle y se une a los pri-miRNAs(273,276), posteriormente Drosha corta de forma asimétrica y específicamente las dos hebras de la horquilla en los sitios cerca de la base del bucle; y finalmente libera un pre-miRNA de 60 a 70 nucleótidos que tendrá un fosfato en 5' y un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3'(273,274,276). Los pre-miRNA son posteriormente transportados al citoplasma por la proteína Exportin-5 (Exp5) (un miembro de la familia de receptores de transporte de Ran)(277,278). Una vez en el citoplasma, los pre-miRNAs son procesados por otra proteína llamada Dicer, una segunda endonucleasa de ARNasa III(279,280). En este paso, se cree que el dominio PAZ de Dicer reconoce primero el saliente 3' de 2 nucleótidos, luego Dicer corta 20-22 nucleótidos de miRNA doble de cadena con el extremo 5' con un fosfato y un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' desde el extremo de la base de la horquilla(281). Una hebra del dúplex de miRNA, la hebra guía, se une a una proteína Argonauta y se selecciona para formar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que contiene el miRNA maduro de 22 nucleótidos. El dúplex de miRNA es separado por la helicasa en dos cadenas simples, miR-xxx-3p y miR-xxx-5p que se incorporan al complejo RISC que induce el silenciamiento genético a nivel postranscripcional(282). A

través del complejo RISC los miRNA se unen al extremo 3' de la región no traducida del mRNA (3'UTR) e inhiben la expresión génica mediante la escisión directa de los mRNA o la represión de la traducción mediante una complementariedad perfecta o casi perfecta entre los miRNA y los mRNA diana. Se han descrito múltiples funciones de los miRNAs(283), sin embargo, la regulación postranscripcional parece la más importante. Por lo tanto, en la mayoría de los casos para identificar las funciones de los miRNA desregulados, es necesario descifrar sus genes diana. Pero esta tarea se antoja muy compleja, ya que cada miRNA puede tener como dianas múltiples mRNAs y, al mismo tiempo, un mRNA está regulado por múltiples miRNAs diferentes. Para aumentar su complejidad, sabemos que las interacciones miRNA-diana dependen del contexto celular y del transcriptoma asociado específico, que genera un targetoma dependiente del tipo celular para cada miRNA que también es variable según los tipos de tumores(284).

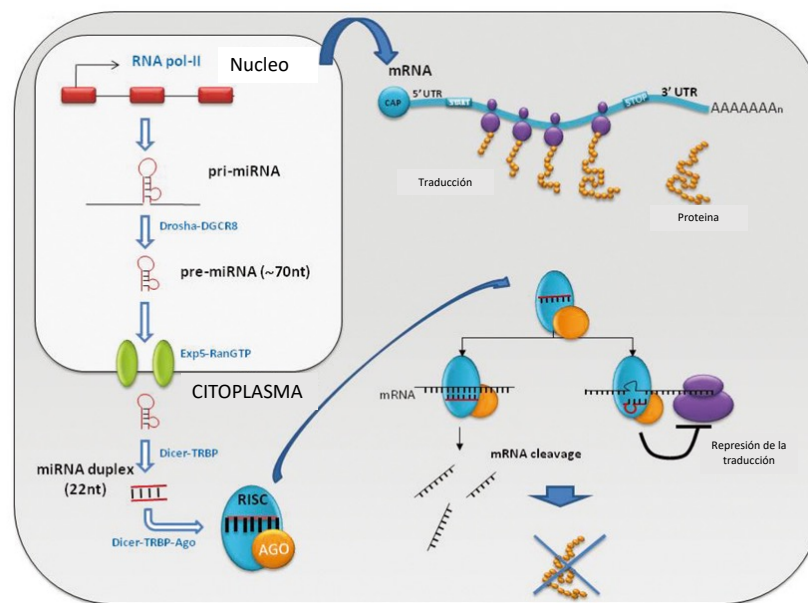


Figura 8. Representación gráfica de la biogénesis de los miRNAs. Adaptado de Navarro A y Monzo M; Yonsei Med J. 2010(285).

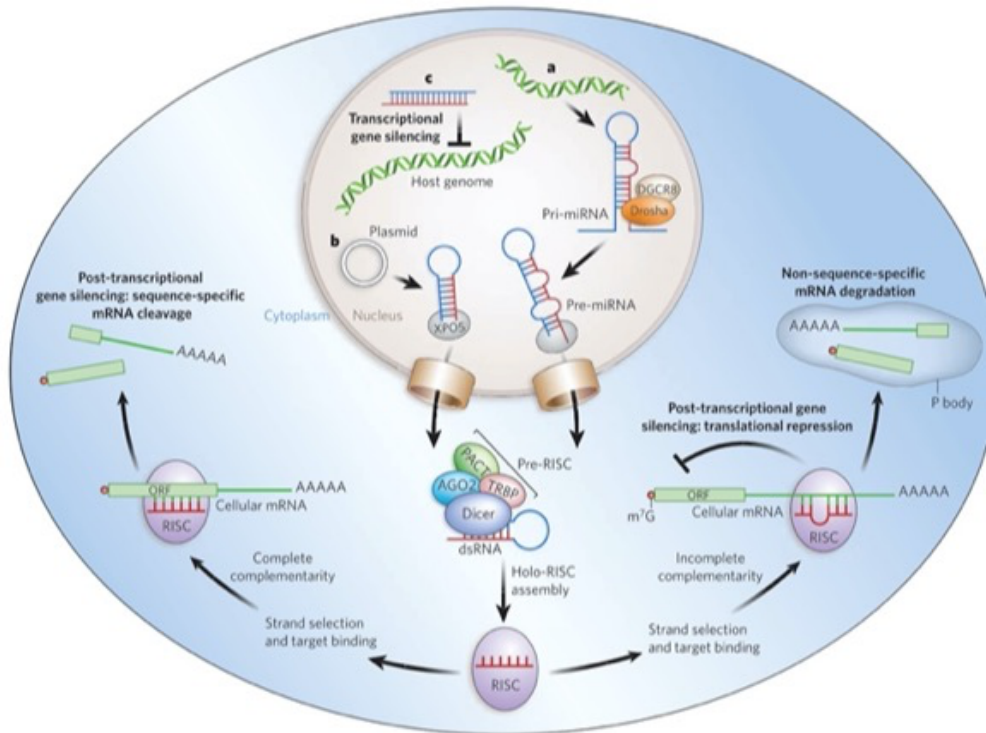


Figura 9. Representación de la biogénesis de los miRNAs y los mecanismos de silenciamiento de genes celulares. Adaptado de Castanotto D. y Rossi JJ; Nature, 2009(286).

1.2.2.2. Funciones y regulación de la expresión de los miRNAs

Múltiples estudios han intentado describir los diferentes miRNAs existentes en las diferentes especies. En humanos se han descrito unos 2.654 miRNAs maduros según las estimaciones de miRBase v. 22; sin embargo, otras bases de datos, como MirGeneDB2.0, reducen este número a 588 miRNAs(287). A pesar de las discrepancias en los números absolutos, es evidente que los miRNAs tienen efectos de gran alcance en los procesos biológicos, ya que más del 60% de los genes codificantes son objetivos potenciales de los miRNAs(288,289). Además, los miRNAs se conservan en regiones calientes del ADN durante la evolución sugiriendo su papel clave en los procesos fisiológicos y el desarrollo de los animales(290).

Los miRNAs se pueden considerar como moduladores epigenéticos de la expresión

génica, ya que, sin modificar la secuencia del ADN influyen en su traducción a proteínas que van a suponer la herramienta funcional del organismo(291). Se han descrito tres mecanismos principales mediante los cuales los miRNAs van a regular la expresión de los genes, pero con el mismo resultado sobre la traducción postranscripcional de las proteínas:

- 1- Represión de la traducción y degradación del ARN mensajero: Como se ha descrito anteriormente, los miRNA se unen al extremo UTR 3' de las regiones de los ARN mensajeros no traducidas para suprimir la traducción de las proteínas o provocar la degradación de los mRNAs(292). El emparejamiento entre el miRNA y el mRNA diana puede ser perfecto o casi perfecto(283). El grado de degradación del mRNA va a depender del número de lugares de unión entre ambas cadenas.
- 2- También se ha descrito una función inversa mediante la cual pueden aumentar la traducción de regiones dianas específicas. Se sabe que el miRNA se une a la región 5' del extremo UTR del ARN mensajero(292). Sin embargo, actualmente no se conoce el mecanismo subyacente de esta función; los estudios realizados sugieren que los miRNA podrían obstaculizar el movimiento de los ribosomas a lo largo de los mRNAs y reprimir la traducción a proteínas(293). Un ejemplo de este mecanismo es el miR-172, que regula la expresión génica reprimiendo la traducción, aunque puede complementar perfectamente al mRNA de *APETALA2* (AP2)(294).
- 3- Desintegración del ARN mensajero: Después de la transcripción, siempre se agrega una cola poli A al extremo 3' del mRNA para mantener la estabilidad y evitar su descomposición(295). Diferentes estudios han encontrado que los miRNAs están involucrados en la desintegración del mRNA acelerando la eliminación de la cola de poli (A)(296–299).

Numerosos estudios se han centrado en la evaluación de la expresión de miRNAs y han mostrado cambios importantes en los perfiles de expresión génica en diversas enfermedades cardíacas(300), neurológicas(301) o inflamatorias(302,303), aunque la influencia más importante se ha observado en el cáncer(304). Los resultados de estos estudios apuntan a que el perfil de expresión de los miRNAs en individuos que padecen estas enfermedades podrían ser una herramienta importante para el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de dichas enfermedades. En este trabajo nos centraremos en el

papel de los miRNAs en cáncer.

Dado que los miRNAs tienen un papel central en la regulación de la expresión génica, su expresión debe estar estrictamente controlada por diferentes mecanismos epigenéticos(305). Las modificaciones del ADN y las modificaciones postraduccionales (MPT) de las histonas son los dos mecanismos que más se han estudiado(306).

1- Metilación del ADN: La modificación más frecuente del ADN implica la unión covalente de un grupo metilo a las bases de citosina ubicadas en los dinucleótidos CpG (nucleótido de citosina seguido de un nucleótido de guanina en la secuencia lineal de bases en la dirección 5' → 3' unidas por un fosfato, 5'- C-fosfato-G-3'). Estos CpG se presentan en islas CpG, ubicadas en las regiones promotoras proximales de casi la mitad de todos los genes humanos(307,308). La metilación del ADN es la modificación principal de los genomas eucariotas relacionada con la regulación a la baja de la expresión génica durante las primeras etapas del desarrollo, lo que permite la expresión de un gen en particular si los factores de transcripción apropiados están presentes y la estructura de la cromatina es accesible(309,310). Con el desarrollo del organismo, la metilación del ADN ayuda a restringir los linajes de células embrionarias y evita la regresión de estas a un estado indiferenciado(311). Los miRNAs están solapados con islas CpGs de forma significativa, lo que sugiere una regulación preferencial mediante este mecanismo(305). En algunas situaciones patológicas, como el cáncer, se han observado dos eventos epigenéticos fundamentales en este sentido:

A) la hipometilación global de los residuos de CpG que no forman una isla CpG, que está relacionado con la inestabilidad genómica. Este mecanismo puede suponer una forma de activación de recombinación mitótica o de activación de transposones(312,313).

B) la hipermetilación de áreas promotoras de los genes, especialmente de islas CpG asociadas con el correspondiente silenciamiento de genes supresores de tumores(309,314). Los genes de miRNA se han encontrado con frecuencia en las regiones genómicas asociadas al cáncer(315) con funciones opuestas, como oncogenes o como supresores de tumores(316). Por ejemplo, varios estudios han

demostrado que los miRNA supresores de tumores, como el miR-203, pueden silenciarse mediante la metilación aberrante de islas CpG adyacentes a sus promotores(317,318). Por otro lado, un miRNA puede tener una región promotora enriquecida en residuos CpG sin ser una isla CpG, como miR-34a, cuyos niveles de expresión están modulados por metilación de los residuos CpG ubicados en la región que comprende hasta 2,5 kb de su TSS en su promotor(319).

- 2- Modificaciones postraduccionales de las histonas: La represión de la transcripción génica se puede asociar con mecanismos postraduccionales en las espirales amino terminales de las histonas, lo que conduce a modificaciones de la cromatina, generalmente al alterar su estructura, que afectan la expresión génica. La cromatina está integrada por nucleosomas, que consisten en ADN envuelto dos veces alrededor de un octámero de histonas, cada una de las cuales contiene dos copias de cuatro histonas altamente conservadas (H2A, H2B, H3, H4), que son susceptibles a MPTs como son la metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación o la ADP-ribosilación(320,321). De hecho, los tipos de modificaciones mejor estudiados son la acetilación y metilación de lisina; mientras que la acetilación de lisina puede relajar la estructura de la cromatina y mejorar la activación de la transcripción, la metilación de lisina puede causar diferentes efectos sobre la expresión génica, dependiendo de las posiciones y el grado de metilación. La metilación en H3K4, K36 y K79 está asociada con la activación de genes, mientras que la metilación en H3K9, H3K27 y H4K20 se correlaciona con la represión transcripcional(320,321). Un ejemplo de este tipo de control epigenético lo encontramos en miR-21, que se ha demostrado que desempeña un papel oncogénico en la mayoría de los tumores al bloquear la diferenciación celular y promover la proliferación de las células tumorales(322). Zhou y colaboradores demostraron que RBP2, una histona 3 lisina 4 (H3K4) desmetilasa, regulaba negativamente la expresión de miR-21 al reducir la trimetilación de H3K4 en la región promotora proximal de miR-21 en células de leucemia mieloide crónica(323).

1.2.2.3. miRNAs y cáncer

En el contexto del cáncer, los miRNAs son el tipo de ncRNA mejor estudiados si los comparamos con los tsRNAs o los piRNAs, entre otros. Los miRNAs se encuentran alterados en todos los tipos tumorales en los que se han estudiado(324), además las alteraciones de la expresión de los miRNA representan un papel importante en los diferentes procesos moleculares y celulares implicados en la carcinogénesis(325,326). Cada vez hay más evidencia de las diferentes funciones de estos biomarcadores epigenéticos, sin embargo, sus funciones principales serán como supresores de tumores u oncogenes que promuevan el crecimiento tumoral y su evolución en forma de metástasis(263). Es importante destacar que un solo miRNA puede regular más de una diana y, viceversa, los ARN mensajeros pueden estar regulados por varios miRNAs(327). Por tanto, los miRNAs controlan la expresión de miles de genes tanto codificantes como no codificantes, incluyendo aquellos con un papel fundamental en la oncogénesis como los oncogenes *RAS*, *MYC* y *EGFR* o los genes supresores *TP53*, *PTEN* y *BRCA1*. La **tabla 9** contiene una selección de miRNAs de los que disponemos estudios *in vivo*, demostrando su implicación diferentes tipos tumorales.

A- miRNA como oncogenes:

Diferentes estudios han demostrado que los miRNAs pueden funcionar como oncogenes, promoviendo el crecimiento celular alterado y contribuyendo a la oncogénesis (**figura 10**). Estos miRNA pueden inhibir directamente la actividad de los supresores de tumores o indirectamente eliminando los reguladores genéticos de la actividad del oncogén. Por ejemplo, miR-155 puede promover la proliferación anormal de células B, iniciando una serie de cambios que conducen al desarrollo de leucemia y linfoma(328–330). Es importante destacar que la administración de antimiR dirigidos a miR-155 puede inhibir el crecimiento tumoral(328,331). Otro miRNA, miR-21, se sobreexpresa en el linfoma de células pre-B y se ha relacionado con otros tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón, al dirigirse a los reguladores negativos de la señalización de *RAS*(332,333). Además, miR-21 actúa sobre el gen supresor *PTEN* permitiendo una mayor proliferación y capacidad de invasión celular(334). En los glioblastomas, un miRNA oncogénico, miR-10b, se expresa en niveles más altos que en el tejido cerebral normal y es necesario para el crecimiento

tumoral(335). Otra familia de miRNAs, miR-17-92, es un buen ejemplo de miRNAs oncogénicas. En comparación con los análisis sobre muestras de tejidos normales, la expresión de miR-17-92 aumenta significativamente en varios tipos de tumores, incluido el cáncer de pulmón y los linfomas, especialmente en sus formas más agresivas, como el cáncer de pulmón de células pequeñas y los linfomas de células B(336,337). El grupo miR-17-92 también influye en aumento del crecimiento de células de cáncer de pulmón(336). En un ensayo realizado con ratones transgénicos mediante células madre hematopoyéticas, la sobreexpresión de miR-17-92 aceleró significativamente la formación de tumores malignos linfoides(337,338). Todos estos hallazgos sugieren que miR-17-92 funciona como un oncogén. Varios estudios indican que más de 600 genes son posibles dianas de miR-17-92(339,340). Otros estudios han reportado que dos genes supresores de tumores, *PTEN* y *RB2*, son diana de miR-17-92(341). *PTEN* promueve la apoptosis a través de la vía P13K-Akt-PKB(342). Otros estudios han informado que la expresión de miR-17-92 está relacionada con la expresión del gen *c-Myc* (que regula la proliferación celular, el crecimiento y la muerte celular mediada por apoptosis del 10-15% de los genes); ambos regulan la expresión del gen *E2F1* (factor de transcripción del ciclo celular)(343,344). Por último, miR-372 y miR-373, relacionados con tumores germinales testiculares, promueven la proliferación celular y el desarrollo de tumores al neutralizar la inhibición de quinasas de ciclina mediada por *p53*, posiblemente a través de la inhibición directa de la expresión del gen supresor de tumores *LATS2*(345,346).

Un efecto interesante que ocurre en relación con los miRNAs oncogénicos es la adicción al oncogén (oncomiR addiction), los tumores van a depender de la expresión continua de los miRNAs para sobrevivir(347). Este fenómeno nos hace pensar que los miRNAs podrían ser, por lo tanto, objetivos potenciales importantes de la terapia dirigida; de hecho, se ha publicado en 2019 un estudio que demostró el potencial de dirigirse a los oncomiR sobreexpresados de manera única en los tumores de páncreas con alteración de *KRAS*(348).

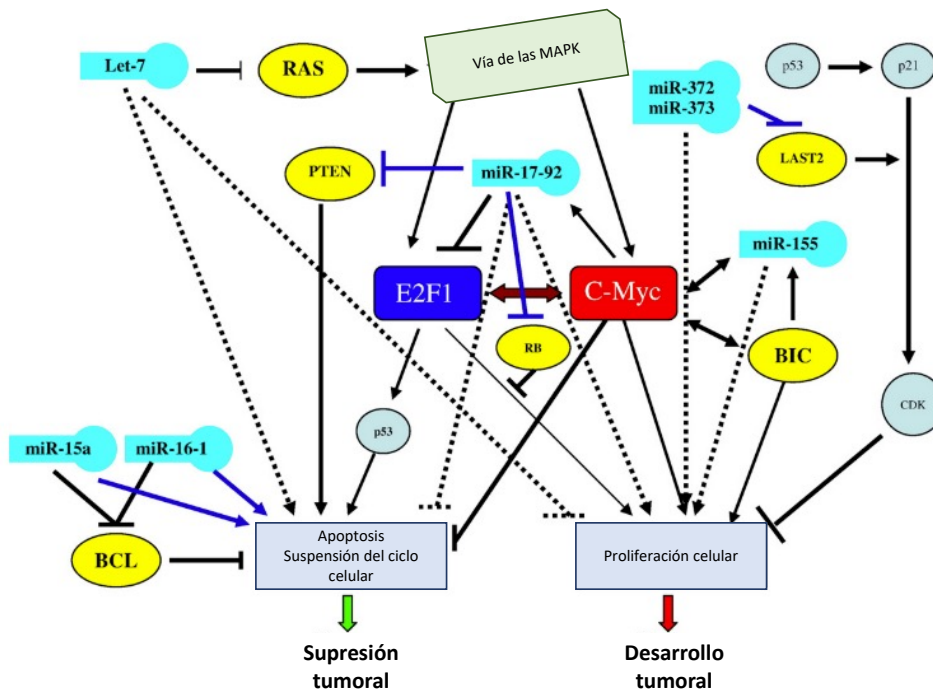


Figura 10. Modelo esquemático que muestra los mecanismos moleculares de los miRNAs que actúan en la patogénesis del cáncer. Adaptado de Zhang et al. *Developmental Biology*, 2006(316).

B- miRNA como supresores de tumores:

Los miRNAs también pueden actuar como supresores de tumores, y cuando se pierde su función, también se pierde su poder protector. Un ejemplo es let-7, que se dirige al transcrito del gen *RAS* reprimiéndolo de forma que se frena la progresión del ciclo celular y la proliferación(349). *RAS* comprende una familia de oncogenes implicados en aproximadamente un tercio de todos los tumores(350). La expresión de let-7 puede reducir los niveles de *RAS*, lo que sugiere que actúa como un supresor de tumores y podría usarse como una diana terapéutica(349). Otro ejemplo son miR-15a y miR-16-1, que suelen actuar como supresores de tumores cuando se eliminan ya que su función es incrementar la apoptosis y la inhibición de la proliferación al dirigirse al gen B de células de linfoma 2 (*BCL2*)(351), un gen clave en diferentes tumores; se han asociado con el desarrollo de leucemia linfocítica crónica (LLC), el tipo más común de leucemia(262,352). Además, miR-34a, un miembro de una familia de miRNAs muy

conservada y redundante(353), regula la expresión de varios oncogenes y es un objetivo directo en la vía descendente de p53(354–357). miR-34a ha sido descrito como marcador pronóstico subrogado cuando está expresado a la baja en tumores pulmonares no célula pequeña(358). Estos miRNAs también están desactivados en diferentes tipos de tumores, como el mieloma múltiple, el linfoma de células de mangle y el cáncer de próstata(324).

C- miRNA dependientes del contexto celular:

Algunos miRNAs funcionan como supresores de tumores u oncogenes, según el contexto. Un ejemplo notable es el miR-29, que ayuda a prevenir la progresión de la enfermedad en la forma indolente de linfoma de células B, pero también está elevado en la leucemia mieloide aguda y la forma más agresiva de linfoma de células B, lo que implica que también puede funcionar como un oncogén(359). Otro ejemplo es el cluster miR-17-92, que actúa sobre los genes supresores *PTEN* y *RB2* influyendo en la proliferación celular y el ciclo celular, pero también sobre el oncogen *c-MYC*(316,338,344).

Tabla 9. Representación de miRNAs oncogénicos y supresores de tumores con evidencia científica *in vivo*.

A- miRNAs oncogénicos

Nombre	Tipo de tumor	Mecanismo relacionado con cáncer
miR-10b(318)	Mama, glioblastoma	Transcritos que codifican reguladores de la progresión del ciclo celular, migración, invasión y desarrollo de metástasis.
miR- 17–92(337,344)	Pulmón, linfoma células B	Transcritos de genes supresores <i>PTEN</i> , <i>RB2</i> y <i>c-MYC</i> , que controlan la apoptosis y la proliferación y crecimiento celular.
miR-21(332,334)	Pulmón, linfoma de células B	Transcritos que codifican reguladores negativos de la señalización de <i>RAS</i> , lo que conlleva a un aumento de la proliferación y disminución de la apoptosis.
miR-31(360)	Pulmón, mama	Transcritos que codifican reguladores de <i>RAS</i> , <i>WNT</i> y <i>TGF-β</i> , aumentando la proliferación, renovación de células madre y desarrollo de metástasis.
miR-155(329,330)	Linfoma	Transcritos de <i>SHIP1</i> , un regulador negativo de

		<i>AKT</i> , para aumentar la proliferación y la supervivencia celular.
miR-221(361)	Hepatocarcinoma	Transcritos de supresores tumorales y del ciclo celular (<i>p.27</i> o <i>PTEN</i>) para aumentar la proliferación y disminuir la apoptosis.
miR-372 y miR-373(345)	Tumor germinal testicular	Inhibición de <i>LATS2</i> , gen implicado en la acción sobre las ciclinas del ciclo celular de P53.

B- miRNAs supresores de tumores

Nombre	Tipo de tumor	Mecanismo relacionado con cáncer
Let-7(280,350)	pulmón	Transcritos para oncogenes, incluyendo <i>RAS</i> , lo que suprime la progresión del ciclo celular y la proliferación.
miR-15a/16-1(351,352)	Próstata, leucemia	Transcritos que codifican ciclinas, quinasas de ciclinas y proteínas antiapoptóticas, lo que incrementa la apoptosis y la inhibición de la proliferación.
miR-34a(355)	Pulmón, mama, próstata	Transcritos oncogénicos que codifican ciclinas, proteínas de la adhesión celular, proteínas de los receptores de tirosina quinasa, disminuyendo la proliferación celular, la invasión y la supervivencia celular.
miR-122(263)	Hepatocarcinoma	Expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico, la proliferación celular y la inflamación.
miR-506(362)	Ovario	Transcritos de <i>SNAI2</i> para disminuir su expresión e inhibir la migración e invasión celular y la transición de célula epitelial a mesenquimal.

C- miRNAs cuya función depende del contexto celular

Nombre	Tipo de tumor	Mecanismo relacionado con cáncer
miR-26a(363)	Glioma, leucemia, hepatocarcinoma, CCR	Transcritos tanto de supresores tumorales (<i>PTEN</i>) como de ciclinas (<i>CCND2/E2</i>) para aumentar o disminuir la proliferación celular según el contexto celular
miR-29(359)	glioblastoma, leucemia	Transcritos de promotores de la proliferación de células B, pero también disminuye la expresión de transcritos de genes implicados en el aumento del metabolismo lipídico (<i>SCAP</i> , <i>SREBP-1</i>), la proliferación (<i>CDK6</i>) y la apoptosis (<i>MCL-1</i>)

1.2.2.4. miRNAs en cáncer de recto

Como hemos visto, los miRNAs están implicados en diversos procesos biológicos relacionados con el desarrollo de múltiples tipos tumorales. Debemos analizar ahora de manera específica el papel de los miRNA en el cáncer de recto. Lo haremos enfocando tres aspectos fundamentales: A) su expresión en tejidos tumorales; B) su implicación pronóstica

y; C) su relación con la respuesta tumoral.

A- Expresión de miRNA en tejido tumoral:

Se han realizado diversos estudios en los que se han analizado muestras de cáncer de recto y tejido de mucosa normal para estudiar la diferencia de expresión en ambos contextos. En un primer análisis, Slattery y colaboradores compararon muestras parafinadas de tejido de cáncer colorrectal con muestras de tejido normal. Todas las muestras se subdividieron según su estado de fenotipo de metilador de isla CpG o el estado mutacional de *KRAS* o *p53*, revelando firmas de 129, 143 y 136 miRNA diferencialmente expresados, respectivamente. El mismo análisis mostró diferencias moleculares entre el cáncer de colon y de recto(364–366). Un estudio similar realizado por Li *et al.* con chips de Array miRCURY y validados por RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) analizó los perfiles de expresión de seis muestras de tejido de cáncer rectal y tejido no tumoral adyacente emparejado, los autores identificaron 67 miRNA regulados al alza y 39 miRNA regulados a la baja asociados con el CR(367). En un estudio más amplio, se analizaron biopsias de tumores y muestras de mucosas apareadas de 57 pacientes con CR localmente avanzado. Cuarenta y nueve miRNAs fueron diferentes entre el tejido normal y el tejido con cáncer rectal, 20 de estos 49 miRNAs estaban regulados al alza mientras que 29 estaban regulados a la baja en el CR frente a la mucosa. En un estudio más grande, se perfilaron biopsias de tumores y muestras de mucosas coincidentes de 57 pacientes con CR localmente avanzado. Cuarenta y nueve miRNA diferían con importancia significativa entre el tejido normal y el tejido con CR, 20 de estos 49 miRNA estaban regulados al alza mientras que 29 estaban regulados a la baja en el CR frente a la mucosa. En ambos estudios se describieron 11 miRNAs (367,368). Siete miRNAs estaban significativamente regulados al alza (miR-17, -18a, -21, -31, -135b, -223 y -492) mientras que cuatro estaban significativamente regulados a la baja (miR-29c, -145, 147b y -375). Podemos destacar, así mismo, un estudio con 109 muestras pareadas de CR y mucosa sana; (370)los autores encontraron que miR-34a, miR-155 y miR-200c, miRNAs que se han encontrado regulados diferencialmente en varios tipos de tumores, estaban regulados al alza en el tejido tumoral ($p= 0,001, 0,005$ and $0,001$, respectivamente), tras ser analizados con qPCR (PCR cuantitativa o *quantitative PCR* en inglés)(369).

Otros miRNAs que se han mencionado anteriormente (ver apartado 1.2.2.3) y relacionados con varios tipos de tumores también se han encontrado en el cáncer de recto, como miR-31(370), que se expresa en mayor cantidad en tumores colorrectales más agresivos(371). Además, la sobreexpresión de miR-135b por pérdida de *APC*, desregulación de la vía *PTEN/PI3K* y sobreexpresión de *SRC* promueve la transformación y progresión tumoral en tumores colorrectales(372). Por el contrario, miR-195 reprime el crecimiento y la invasión tumoral a través de esta misma vía molecular además de bloquear la expresión de *IGFI*(373). El nivel de expresión de miR-3174, estudiado por qRT-PCR, se encontró significativamente más expresado en CR al dirigirse a la vía de *PCBD2*, inhibiendo de esta forma la apoptosis y promoviendo la proliferación celular(374).

Correlación con parámetros clínicos:

Varios estudios han analizado el papel pronóstico de los miRNAs en el cáncer de recto. Gaedcke y colaboradores correlacionaron la expresión en tejido tumoral de miR-135b con la SLE y específica del cáncer en una cohorte de 116 pacientes(368). Otros grupos también han considerado importante el papel de miR-135b en este tipo tumoral. Xu *et al.* usaron tejidos congelados, donde realizaron análisis de qPCR y encontraron que miR-135b estaba regulado al alza 17,7 veces entre los miRNA sobreexpresados en los casos de estadio IV de Duke (que se sabe que tienen un mal pronóstico)(375). También identificaron que miR-145 está altamente regulado a la baja con un entre -18 y -23 en los estadios clínicos de cáncer colorrectal II, III y IV respectivamente(375). Además, la expresión de miR-374a estaba significativamente disminuida para la identificación de pacientes sin metástasis, su eficacia se confirmó con una sensibilidad del 93,33% pero con una baja especificidad (66,67%)(375). miR-4634 se relacionó con metástasis en ganglios linfáticos en estadio III con una sensibilidad del 75 % y una especificidad del 83,33 %(375). Es importante destacar que este estudio se llevó a cabo en una población mixta de cáncer de colon y recto(375).

Un segundo estudio analizó 1.141 casos de CCR con microArrays para identificar el impacto de 121 miRNA en el estadio de la enfermedad y la supervivencia(376). Cinco miRNAs se asociaron con un estadio avanzado de enfermedad: miR-145-5p y miR-31-

5p se encontraban aumentados y miR-200b-3p, miR-215 y miR-451a disminuidos en las muestras de pacientes con estadio avanzado (CCR). En las muestras de cáncer de recto, los autores identificaron 13 miRNAs que se encontraban asociados significativamente con la mortalidad tras el diagnóstico de cáncer(376). En este mismo análisis la expresión de miR-21 tenía una asociación inversa con la mortalidad de los pacientes con diagnóstico de cáncer de recto (pero no en pacientes con un tumor de colon) (376). Sin embargo, Nielsen *et al.* utilizaron hibridación in situ y qPCR en tiempo real en tejidos parafinados e identificaron miR-21 como predecir de una SLE breve en el cáncer de colon, pero no en el cáncer de recto(377). Un estudio asiático con muestras de 40 pacientes reportó una sobreexpresión significativa de miR-21, miR-155, miR-29a y miR-92a en muestras de cáncer de recto, aunque solo miR-155 demostró capacidad de discriminar la afectación nodal (positiva contra negativa) así como entre los estadios A/B de C/D de Duke(378).

Finalmente, otro estudio asiático incluyó 65 muestras de pacientes con un CR localmente avanzado tomadas antes de la QRT, las muestras se analizaron mediante RT-PCR, los resultados evocaron que un alto nivel en tejido de miR-199a-5p se asociaba con un mejor pronóstico(379).

B- Predicción de la respuesta al tratamiento neoadyuvante:

Uno de los mayores retos en oncología es detectar aquellos pacientes que responderán o no a una determinada terapia o biomarcadores que nos dirijan el tipo de tratamiento de elección. En el cáncer de recto localmente avanzado, como se ha referido en otros apartados del texto, sería importante saber qué pacientes no van a responder a la QRT para evitar posibles comorbilidades y el retraso del tratamiento de elección, la resección tumoral. La respuesta en los tumores rectales se evalúa a nivel anatomopatológico mediante la clasificación de Dworak (Tabla 5).

Svoboda *et al.* realizaron análisis de microArrays en biopsias tumorales de 31 pacientes con cáncer de recto localmente avanzado antes y 2 semanas después de la QRT con capecitabina(380). Encontraron un aumento significativo de los niveles de expresión de miR-125b y miR-137 después de 2 semanas de tratamiento y que estos niveles se asociaban con una peor respuesta(380). Sin embargo, cabe destacar que el tamaño de la

muestra es bastante reducido (31 pacientes), y describen una variabilidad intertumoral. Curiosamente, el mismo grupo analizó una cohorte de pacientes del mismo tipo (n=20), cuyos tumores se clasificaron como los de mayor sensibilidad (n=10) o más resistentes (n=10). Utilizaron el análisis TaqMan Low Density Arrays para cuantificar 667 miRNAs humanos en las muestras de tejido tumoral (biopsias preoperatorias de tumores primarios no tratados) y encontraron que 8 miRNAs se expresaban de manera significativamente diferente entre los respondedores y los no respondedores: miR-215, miR-190b y miR-29b-2 se sobreexpresaron en los que no respondieron, mientras que let-7e, miR-196b, miR-450a, miR-450b-5p y miR-99a se redujeron en los que no respondieron(381).

Drebber y colaboradores demostraron una correlación significativa entre una baja expresión de miR-145 en el tejido tumoral post-terapéutico y una peor respuesta a la QRT(322). Sin embargo, miR-145 se midió en el tejido tumoral postterapéutico, lo que no responde al problema de predecir la respuesta a la terapia(322). Más adecuado con esta pregunta fue el estudio de Della Vittoria Scarpati *et al.*, donde los autores analizaron la expresión de miRNAs mediante microarrays con confirmación por qRT-PCR en biopsias de tumores primarios de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado que se trataron con QRT previa a la cirugía (n = 38)(361). Once miRNAs aumentaron significativamente en pacientes con una respuesta completa (miR-1183, miR-483-5p, miR-622, miR-125a-3p, miR-1224-5p, miR-188-5p, miR-1471, miR-671-5p, miR-1909, miR-630 y miR-765) y dos resultaron regulados a la baja (miR-1274b y miR-720)(361). Sin embargo, ninguno de los 13 miRNAs reportados por este estudio se encontró cuando Kheiriseid *et al.* realizaron un estudio similar mediante el análisis de microarrays de 12 muestras de tejido parafinado de tumores rectales tomados antes del tratamiento(382). Los miRNAs encontrados en este estudio fueron miR-16, miR-590-5p y miR-153, que predijeron una respuesta completa o incompleta y miR-519c-3p y miR-516 que discriminaron entre una respuesta buena o mala(382). Aunque no se reporta la alteración de los miRNA entre los respondedores y los no respondedores.

Otro estudio realizado sobre biopsias congeladas frescas de 43 pacientes con cáncer de recto tomadas antes de la QRT demostró que miR-223 se expresa más en tejidos de pacientes con una buena respuesta sugiere que este como un biomarcador prometedor para la predicción de la respuesta a la QRT(383). También podemos destacar otros

estudios que han hallado diferentes miRNA en el contexto del cáncer de recto. Lopes-Ramos *et al.* informó que miR-21-5p se sobreexpresaba en biopsias tumorales de pacientes con CR con respuesta completa usando biopsias frescas congeladas en nitrógeno líquido(384), Bhangu *et al.* sugirieron que miR- 200c es un posible biomarcador para predecir la respuesta a la QRT neoadyuvante tras encontrar una expresión reducida en muestras parafinadas de pacientes no respondedores(385).

Además de los estudios en muestras de tejido se han realizado análisis en plasma de pacientes en este mismo contexto clínico. En un estudio alemán se analizaron muestras de plasma mediante qPCR, los autores pudieron ver una disminución significativa de miR-18b y miR-20a durante la QRT en pacientes con un estadio ganglionar negativo tras la neoadyuvancia (ypN0) en comparación con los que presentaban un estadio ganglionar positivo (ypN+)(386). Un estudio chino publicado en 2021 analizó plasma de 20 pacientes con CR localmente avanzado. Los autores seleccionaron miRNAs de dos bases de datos de análisis por secuenciación de ARN y que se expresaban de manera diferencial en pacientes respondedores a la QRT para confirmar su expresión en biopsias líquidas de su muestra mediante qPCR. Se verificó que miR-30e y miR-210 estaban regulados al alza en respondedores. Los estudios posteriores de biopsia líquida revelaron que el nivel sérico de miR-30e se asoció 2,47 veces más con pacientes respondedores en comparación con los que no respondieron a la QRT ($p=0,038$)(387). No es el único estudio que ha utilizado la secuenciación de ARN para el estudio de biomarcadores no codificantes. Kral y colaboradores estudiaron mediante esta técnica muestras de tumores apareados y de plasma, el estudio evocó una firma de miRNAs que distinguía a los respondedores de los no respondedores a la quimioterapia adyuvante; una parte predominante de los miRNAs identificados estaba representada por los miembros de la familia miR-17-92. El examen de estos miRNAs en los exosomas plasmáticos mostró que sus niveles diferían entre los pacientes con CR y los controles sanos y se correlacionaban con la respuesta al tratamiento(388). Un estudio europeo identificó 69 miRNAs con una expresión diferente entre el grupo de respondedores y un grupo de no respondedores a la QRT, sin embargo, solo se confirmó que miR-487a-3p tenía una expresión significativamente mayor en las muestras de biopsia tumoral de los no respondedores ($p<0,0006$, $AUC=0,766$), lo que sugiere que miR-487a-3p podría ser un potencial biomarcador predictivo de respuesta en

pacientes con CRLA(389).

Es interesante destacar otros análisis realizados con los miRNAs como biomarcadores de respuesta, en este caso como marcadores de detección precoz y monitorización de pacientes. Un estudio europeo evaluó los niveles de expresión de miRNA antes y después de la terapia, identificando firmas específicas de miRNAs en relación con el curso de la enfermedad y la respuesta al tratamiento de los pacientes con CR(390). En primer lugar, los autores evaluaron los niveles de expresión de miRNA mediante secuenciación masiva en muestras de plasma de 20 pacientes con CR al diagnóstico y un año después. Tras este análisis seleccionaron miR-122-5p y miR-142-5p para su posterior validación en plasma y vesículas extracelulares de plasma en un grupo independiente de pacientes con CR y sujetos de control. Los niveles de expresión de estos miRNAs fueron significativamente diferentes entre los pacientes y los controles ($p < 0,001$). Un año después del diagnóstico, los perfiles de expresión se modificaron significativamente en pacientes que respondieron al tratamiento y ya diferían de los medidos en individuos sin cáncer. Por otro lado, los pacientes que no respondieron a la QRT mantuvieron bajos niveles de expresión en su segundo análisis. Este estudio nos sugiere que miR-122-5p y miR-142-5p circulantes tienen un alto potencial para el cribado y la detección temprana de CR, así como para la evaluación del pronóstico y de la efectividad del tratamiento(390).

Por último, es importante poner en valor los múltiples análisis *in vitro* que han estudiado este contexto. Un buen ejemplo es el análisis de la sensibilidad a la QRT utilizando 12 líneas celulares de cáncer colorrectal donde se identificó un perfil de expresión de miRNA que indicaba la sensibilidad hacia un tratamiento *in vitro* de 5-FU y radioterapia(391). Los autores validaron mediante la transfección de let-7g, miR-132, miR-224 y miR-320a que mostró un cambio esperado de la resistencia a la terapia hacia la sensibilidad. El estudio pudo validar una mayor expresión de let-7g como marcador de buen pronóstico en muestras de pacientes(391).

1.2.3. *ARNs no codificantes de cadena larga (lncRNAs)*

1.2.3.1. Clasificación y características de los lncRNAs

Los estudios realizados en los últimos 15 años han podido demostrar que gran parte del

genoma humano es funcional y codifica una gran cantidad de ncRNA(259). En concreto, podemos distinguir. Transcritos de ARN que son prácticamente indistinguibles de los ARN mensajeros (codificantes de proteínas). Se trata de los ARN no codificantes de cadena larga, ncRNAs de más de 200 nucleótidos de longitud con nulo o mínimo potencial de codificación de proteínas. El proyecto ENCODE estima que el genoma humano codifica más de 28.000 lncRNAs diferentes, muchos de los cuales están aún por descubrir(259,392). Los lncRNAs son actores cruciales en una variedad de funciones celulares y fisiológicas(393,394). En particular, los lncRNAs desempeñan un papel clave en la regulación de la dinámica de la cromatina, la expresión génica, el crecimiento, la diferenciación y la regulación del desarrollo embrionario, entre otros(395). Si bien la comprensión de las funciones de los lncRNAs y su caracterización detallada son aún desconocidas, el análisis de los perfiles transcriptómicos utilizando la secuenciación de próxima generación ha podido revelar que miles de lncRNAs se expresan de manera aberrante o mutan en varios tipos de cáncer(396).

Los lncRNAs se clasifican ampliamente en función de su localización genómica, modos de acción y función(396,397). Así, según su localización en el genoma encontramos **(figura 11)**:

- 1- LncRNAs intrónicos: originados a partir de los intrones de genes que codifican proteínas.
- 2- LncRNAs intergénicos (lincRNA): se originan en la región entre dos genes codificantes.
- 3- LncRNAs potenciadores (elncRNA): se originan a partir de las regiones potenciadoras del promotor.
- 4- LncRNAs bidireccionales: se localizan cerca de un transcrito codificante de la hebra opuesta.
- 5- LncRNAs con superposición de sentido: se superponen con uno o más intrones y exones de diferentes genes que codifican proteínas en la cadena con sentido del ADN;
- 6- LncRNAs anti sentido: los transcritos anti sentido se originan a partir de las cadenas anti sentido del ADN, y pueden o no ser complementarios a las secuencias codificantes de proteínas en la cadena sentido.(398)

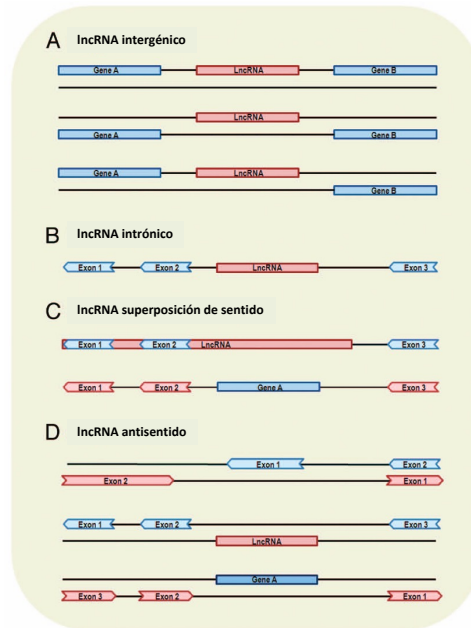


Figura 11. Representación gráfica de los tipos de lncRNAs más comunes según su localización genómica(397).

Funcionalmente, los lncRNAs se clasifican como lncRNAs de señalización, cebos (o señuelo), guía y estructurales(398):

- 1- Señalización: lncRNAs asociados con rutas de señalización específicas, su expresión indica un evento de señalización activo, independientemente de sus roles (directo/indirecto) en el proceso de señalización(398). Por ejemplo, la expresión de *XIST* señala la inactivación de X en mujeres(399).
- 2- Los lncRNAs señuelo actúan como sumideros moleculares para factores de transcripción y represores. Interactúan con los factores de transcripción y los marcan para evitar que se unan a los promotores del gen diana, lo que facilita la activación o el silenciamiento del gen(398). Ejemplos de este tipo de lncRNA pueden ser *GAS5* (específico de detención del crecimiento 5 o *growth arrest specific 5* en inglés) o *TERRA* (ARN que contiene repeticiones teloméricas o *telomeric repeat-containing RNA* en inglés)(398).
- 3- Los lncRNA guía se unen a los complejos proteicos reguladores o enzimáticamente activos y los dirigen a promotores de genes diana específicos o loci genómicos que

regulan las vías de señalización y la expresión génica por la vía descendente. *AIR*, *CCND1* (lncRNA asociado al promotor de ciclina D) o lincRNA-p21 son buenos ejemplos de este grupo de lncRNAs(397,398).

- 4- Los lncRNAs de estructura actúan como una plataforma central a la que se unen varios complejos de proteínas y se dirigen a una ubicación genómica específica o al promotor del gen diana, que regula la expresión génica y la dinámica cromosómica. Como ejemplos podemos destacar *HOTAIR* o *TERC*(398).

Por lo tanto, los lncRNA están implicados en multitud de procesos celulares y biológicos que incluyen la regulación génica y la dinámica de la cromatina. Existe una alta diversidad de este tipo de transcritos y tienen un importante papel en diferentes patologías y en especial en el cáncer. Su expresión aberrante y las mutaciones están relacionadas con la tumorigénesis, la metástasis y la invasión del tumor(400,401).

1.2.3.2. Mecanismos de acción y función de los lncRNAs

Los lncRNAs van a actuar de manera importante sobre la expresión y la actividad génica a diferentes niveles. Su función mejor estudiada es cuando actúan en el núcleo como elementos de regulación de la transcripción. A continuación, describiremos cada una de ellas brevemente:

1- Regulación de las modificaciones de histonas

Hay varios ejemplos destacados de complejos modificadores de histonas interactuando con lncRNAs como son los dos complejos represores polycomb, *PRC1* y, en particular, *PRC2*, que media la metilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me), una histona asociada con loci genéticos reprimidos o equilibrados(402,403). Otro ejemplo significativo es *HOTAIR*, un lncRNA conservado que se transcribe dentro del grupo de genes *HoxC*(404). Se ha demostrado que *HOTAIR* desempeña un papel represor en el locus *HoxD* al interactuar con *PRC2*(405). Además, *HOTAIR* también interactúa con la histona desmetilasa H3K4me1/2 LSD1 (KDM1), que elimina una marca de histona de la cromatina activa y, por lo tanto, refuerza el establecimiento de una cromatina

represiva en los loci objetivo(404,406) (Figura 12). La inactivación de *HOTAIR* en ratones conduce a la desrepresión de los genes expresados y de los genes *HoxD*, que pierden la metilación de H3K27 y ganan marcas de metilación de H3K4, como se espera de la pérdida de la actividad enzimática de *PRC2* y *LSD1* en estos loci(395). Además, los ratones *HOTAIR* knockout han mostrado fenotipos de transformación homeótica esquelética, que son típicos de las mutaciones que afectan a la represión mediada por Polycomb(405). Un ejemplo de un lncRNA que interactúa con el complejo *PRC1* es el lncRNA amplificado focalmente en el cromosoma 1 (*FALI*). La interacción de *FALI* con *BMII*, una subunidad esencial de *PRC1*, regula su estabilidad proteica(407). La eliminación de *FALI* en líneas celulares de cáncer de ovario conlleva cambios en la expresión génica, una progresión más lenta del ciclo celular y la inducción de la senescencia, similar a los efectos de la eliminación de *BMII*(407). Este último fenotipo podría rescatarse parcialmente mediante la eliminación del factor promotor de la senescencia *CDKN1A* (p21)(407). Datos adicionales de secuenciación epigenética ChIP han sugerido que *BMII* se une al promotor de *CDKN1A* y, junto con *FALI*, suprimen la expresión de esta diana y de otros genes(407,408). *ANRIL*, un lncRNA transcrito a partir del locus supresor de tumores *INK4B-ARF-INK4A*, ha sido encontrado en una familia con tumores hereditarios del sistema neural-melanoma con un papel importante en la tumorigénesis(409,410). *ANRIL* recluta *CBX7* (un componente *PRC1*) a través de un mecanismo dependiente de POLII en su locus para reprimir los genes vecinos *INK4BARF-INK4A*, antagonizar la senescencia celular y promover indirectamente la actividad del ciclo celular(411,412).

2- Modulación de la metilación del ADN

La mayoría de los estudios de lncRNAs descritos en el este contexto han evidenciado que van en contra de la metilación del ADN. Con frecuencia, la transcripción de los ARNs no codificantes, que interactúan con las DNMT, mantiene un locus libre de metilación del ADN(413–415) (Figura 12). Un análisis global de todos los lncRNA que se unen a DNMT1 ha podido demostrar que los loci cuyos productos de ARN interactúan con DNMT1 tienen niveles más bajos de metilación del ADN que otros

loci(415). En el caso del reductor del ADN de anti sentido *Tcf21* (TARID), mantiene el gen codificador de proteínas (*Tcf21*) en la hebra de ADN opuesta libre de metilación del ADN requerida, GADD45A, y las proteínas TET, datos que apuntan a un mecanismo que implica la desmetilación activa del ADN(414).

3- Remodelación de la cromatina

Además de la interacción con complejos enzimáticos, que modifican la cromatina de forma covalente, también se ha demostrado que los lncRNA controlan los complejos de remodelación de la cromatina que pueden alterar el espaciado de los nucleosomas de una manera dependiente de la energía. Por ejemplo; en el cáncer de próstata, los análisis de expresión génica han reportado que SWI/SNF y el lncRNA SChLAP1 tienen funciones opuestas. SChLAP1 interactúa con la subunidad SNF5 del complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF e inhibe globalmente la unión de SWI/SNF a la cromatina, lo que posteriormente conduce a la desrepresión de la actividad génica en todo el genoma(416). El complejo SWI/SNF también puede ser reclutado por lncRNAs y mediar en la activación de genes, como se ha encontrado en estudios con células madre de carcinoma hepatocelular(417). Un lncRNA, lncTCF7 o la vía de señalización *WNT* que activa el ARN no codificante (WSPAR), que es transcrito 200 kb anterior en la cadena de *TCF7*, puede reclutar SWI/SNF para el promotor de *TCF7* y, por lo tanto, activar la expresión de *TCF7* y la señalización de *WNT*(417).

4- Interacción con factores de transcripción

También se ha demostrado que los factores de transcripción interactúan con los lncRNA tanto en cáncer como en otras enfermedades. Ciertos lncRNAs se han relacionado de diferentes maneras con factores de transcripción de la vía *NF-KB*. El lncRNA Lethé puede interactuar con RelA y evita que se una al ADN(418). El ARN extragénico de ciclooxigenasa-2 (*COX-2*) asociado a p50 (PACER), por otro lado, secuestra p50, que forma homodímeros y es represor a una alta concentración, reduce su concentración y le permite formar heterodímeros activadores con p65(419). Otro lncRNA, lnc de células dendríticas (lnc-DC) se une al factor de transcripción *STAT3* en el citoplasma y evita su desfosforilación por *SHP1*, activando así *STAT3* y, por lo

tanto, la diferenciación de células dendríticas(420).

Un ejemplo específico en oncología podría ser el mecanismo mediado por lncRNA que vincula la unión del factor de transcripción y las modificaciones de la cromatina para la resistencia del antiestrógeno 4 (*BCAR4*) del cáncer de mama. Este lncRNA se une a la proteína 1 de interacción nuclear SMAD (*SNIP1*) y una fosfatasa (*PNUTS*) involucrada en la regulación de la ARN polimerasa II. En respuesta a la estimulación de citocinas, *BCAR4* eleva el efecto inhibitorio de *SNIP1* sobre p300, una histona acetil transferasa y activador transcripcional. Las histonas acetiladas son necesarias para el reclutamiento de *PNUTS* mediado por *BCAR4*, que a su vez conduce a la polimerasa II activa en los genes controlados por *GLI2*(421).

5- Regulación del genoma a través de formación de bucles y de potenciadores

Está bien descrito en la bibliografía que las transcripciones de ARN producidas en potenciadores activos son funcionalmente importantes(422–424). Un buen ejemplo de este mecanismo en cáncer podría ser los lncRNAs PRNCR1 y PCGEM1, que promueven el bucle potenciador-promotor en las células de cáncer de próstata(425).

6- Regulación postranscripcional

Se cree que los lncRNAs que se encuentran principalmente en el citosol están involucrados en la regulación génica en el nivel postranscripcional (Figura 12). Por tanto, hay diferentes experimentos que han demostrado que varios lncRNAs pueden influir en los patrones de empalme de genes específicos o de forma global al interactuar con factores de ensamblaje. Por ejemplo, MALAT1 es un lncRNA altamente expresado en el núcleo y es un componente general de la maquinaria de empalme y on un rol para varios tipos de tumores en este contexto(426,427). También podemos destacar el papel específico en el citoplasma para el ARN no codificante lncRNA activado por daño en el ADN (NORAD)(428). NORAD secuestra proteínas PUMILIO y, por lo tanto, promueve la estabilidad genómica (Figura 12). La abolición de NORAD conduce a la hiperactivación de PUMILIO, lo que provoca inestabilidad cromosómica y aneuploidía debido a la represión de los ARN mensajeros diana de PUMILIO que funcionan en la replicación del ADN, la

mitosis y la reparación del daño del ADN(428).

Finalmente, hay que destacar el papel importante de los lncRNAs en la diferenciación y proliferación celular. Son conocidos diferentes estudios que demuestran lncRNA como H19(429), Xist(399,430) o NEAT1(431) en la diferenciación y proliferación de tejidos o el desarrollo de la maquinaria hormonal. Estas funciones, fundamentales para el desarrollo celular, nos dan una idea de su influencia en el desarrollo y evolución de las células tumorales cuando se encuentran desregulados.

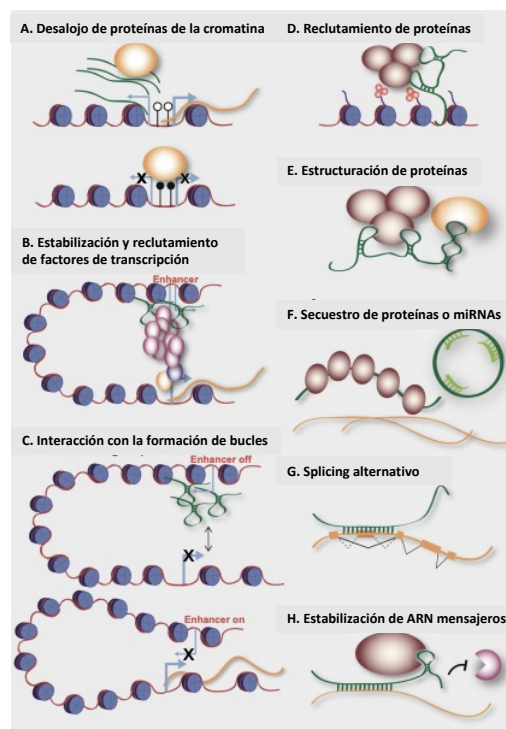


Figura 12. Representación esquemática de los mecanismos celulares que involucran lncRNAs. Adaptado de (432)

1.2.3.3. LncRNAs y cáncer

El cáncer está muy ligado a las diferentes funciones de los lncRNAs. Incluso antes de la

era de la secuenciación de próxima generación, algunos estudios ya habían demostrado que los lncRNAs estaban desregulados en cáncer(433–435). La agrupación en patrones de expresión de lncRNAs se ha podido identificar en diferentes tipos de tumores (Figura 13), sugiriendo además una alta probabilidad de predicción de la respuesta a la terapia dirigida. Podemos destacar el estudio del proyecto del atlas del genoma del cáncer (TCGA) que analizó muestras de más de 5000 tumores. Los datos que mostraron que, había aproximadamente la misma cantidad de genes codificantes de proteínas y de lncRNA desregulados; además, el 60% de los lncRNA mostraban especificidad para un solo tipo de tumor(436).

Además, las alteraciones del número de copias somáticas que se encuentran en el tejido canceroso a menudo incluyen loci de lncRNAs(407,436,437). Por ejemplo, lncRNA FAL1 es un lncRNA que se ha encontrado amplificado en varios tipos de tumores diferentes, participando en la tumorigénesis a través de un mecanismo mediado por *BMII*, se ha correlacionado el nivel de expresión y el número de copias con la supervivencia del paciente(407). Además, se ha demostrado que varios lncRNAs son pronósticos para la SG o el tiempo libre de enfermedad (TLE)(416,421,438). En un estudio diferente, la inhibición de MALAT1 después de la inducción del tumor en ratones redujo la formación de metástasis en un modelo de cáncer de pulmón y en un modelo de cáncer de mama metastásicos(438). Los ratones *knockout* para MALAT1 no mostraron fenotipos evidentes(433,434,438), lo que sugiere que la regulación a la baja de MALAT1 en humanos podría no ser perjudicial para las células humanas normales, lo que lo convierte en un objetivo atractivo para la aplicación en pacientes.

Los lncRNAs están implicados en numerosos procesos biológicos celulares, sobre todo en la invasión y en la formación de metástasis en la progresión de la enfermedad maligna. Un mecanismo que las células pueden emplear para prevenir la formación de tumores es la senescencia inducida por oncogenes(410). El locus *INK4B-ARF-INK4A*, que juega un papel importante en la senescencia, es silenciado en las células en proliferación por las proteínas del grupo Polycomb. Este mecanismo depende del lncRNA ANRIL, que se transcribe desde dentro del locus y actúa en cis(410,439,440). Además, el gen *MIR31HG* ubicado 400 kb en la parte anterior del locus *INK4B-ARF-INK4A*, también codifica un lncRNA involucrado en la regulación de *INK4A*(441). Un tercer lncRNA que funciona

en la senescencia, UCA1, estabiliza los ARN mensajeros de los genes que codifican proteínas implicados en la vía de la senescencia, probablemente mediante el secuestro de hnRNPkA1(442). Además, el supresor de tumores p53 y sus vías de señalización asociadas incluyen lncRNAs. Por ejemplo, p53 se une y regula numerosos lncRNA, como lincRNA-p21, que a su vez regula la expresión génica junto con p53 y p21(443–446). Hay múltiples estudios que relacionan diferentes subtipos de lncRNAs específicos de los diferentes tipos tumorales; la siguiente figura, muestra de forma gráfica y resumida los lncRNAs junto con los tipos de cáncer a los que se asocia.

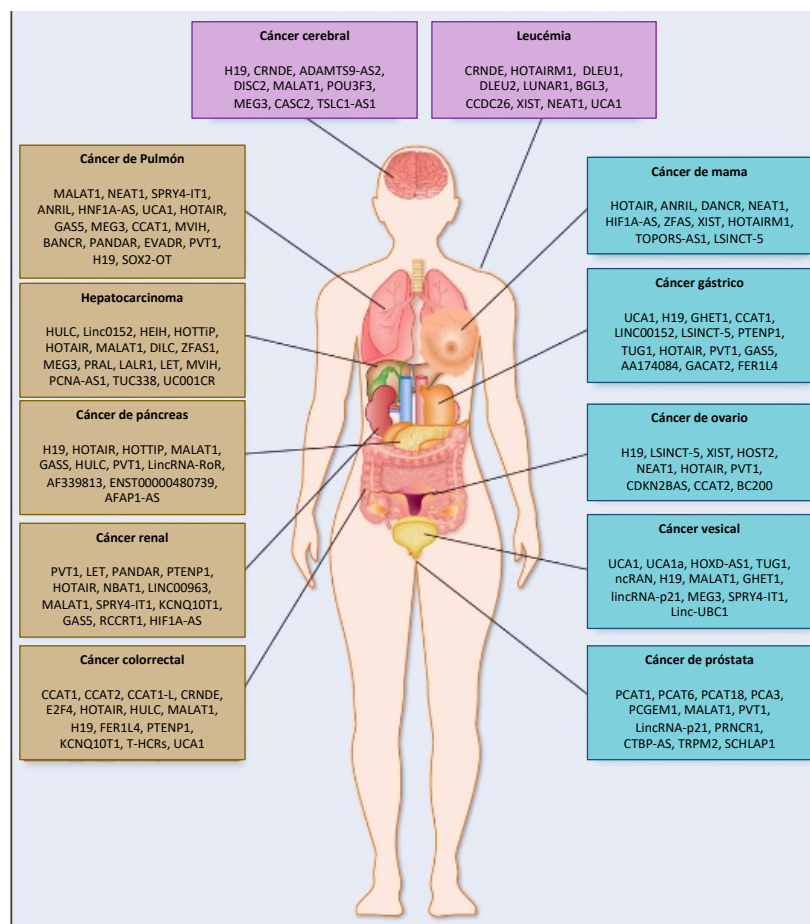


Figura 13. Representación gráfica de los principales lncRNAs que se han relacionado con los diferentes subtipos tumorales(447).

De la misma forma que se ha resaltado para los miRNAs de manera específica, los

lncRNAs pueden actuar en diferentes contextos con una función oncogénica, supresora de tumores o diferente según el contexto en que se expresen y deban actuar.

A- lncRNAs como oncogenes

Muchos lncRNAs cuyas funciones celulares se han estudiado funcionan como oncogenes que promueven el crecimiento tumoral y, a menudo, se sobreexpresan en el cáncer. HOTAIR es uno de los lncRNA oncogénicos mejor estudiados que se ha caracterizado, es un regulador de la familia de genes *HOX*, que ayudan a controlar la identidad celular(406). Sin embargo, HOTAIR tiene un papel más global en el control de la represión génica mediante la selección de *PRC2* y *LSD1/CoREST/REST*, como se ha comentado en el apartado anterior(448,449). La sobreexpresión de HOTAIR se ha asociado con un mal pronóstico en el cáncer de mama y otros tipos tumorales, posiblemente al aumentar la metástasis y la invasión del tumor(395,405,432,449,450). Otro lncRNA oncogénico y tumor específico es SAMMSON, que es necesario para el crecimiento y la supervivencia celular, independientemente del estado mutacional de *TP53*, *BRAF* o *NRAS* en melanoma(451). SAMMSON promueve el crecimiento celular a través de interacciones con las proteínas p32, CARF y XRN2 que ayudan a equilibrar la maduración del ARN ribosómico y la síntesis de proteínas en el citosol y las mitocondrias(451,452). Es importante destacar que el silenciamiento de SAMMSON en modelos de PDX murinos inhibe el crecimiento tumoral, lo que demuestra el potencial terapéutico de este lncRNA(451). Se han descrito varios lncRNAs oncogénicos novedosos, incluidos THOR(453) y ARLNC1(454), así como DSCAM-AS1(455), como ejemplos más destacados de una larga lista (Tabla 10).

B- lncRNAs como supresores de tumores

Algunos lncRNAs actúan contra el desarrollo del cáncer al prevenir la proliferación, activar la apoptosis, mantener la estabilidad genómica o promover la expresión de supresores de tumores. Por ejemplo, MEG3 es uno de los lncRNA supresores de tumores mejor caracterizados. Además de regular la vía de *TGF- β* , MEG3 regula a la baja la expresión de *MDM2* y aumenta los niveles de proteína p53; la regulación de estas y otras vías conduce a una disminución de la proliferación celular(456–458). De acuerdo con su estado como supresor de tumores, a menudo se observa en los tumores la pérdida de

copias de *MEG3* y el aumento de la metilación de CpG de su promotor(432,456). *GAS5* es otro lncRNA con funciones supresoras de tumores, a menudo reguladas a la baja en cáncer y con evidencia in vivo en modelos de mama y glioblastoma(447,459,460). Además, *GAS5* también participa en interacciones con miRNAs que, en última instancia, pueden conducir a una disminución de la proliferación celular y un aumento de la apoptosis, así como a una disminución del potencial migratorio(459,460).

C- LncRNAs dependientes del contexto funcional

Muchos lncRNAs muestran funciones tanto supresoras de tumores como oncogénicas según el contexto en que se expresen y actúen y el tipo celular al que se dirijan. Por ejemplo, en el cáncer de mama, el lncRNA *NKILA* regula negativamente la señalización del factor nuclear kB (*NF-kB*) y la inflamación. En modelos de ratón con líneas celulares de cáncer de mama humano que sobreexpresan *NKILA*, se redujeron las metástasis y se obtuvo una mayor supervivencia, lo que sugiere un papel supresor del tumor(346,461). Sin embargo, también se ha demostrado que el aumento de *NKILA* puede promover la evasión inmune del tumor, una propiedad oncogénica, a través de la muerte celular inducida por la activación de los linfocitos T citotóxicos y las células Th1(462)

Se han realizado múltiples estudios que han encontrados diferentes lncRNAs en relación con la mayoría de los tumores. Además, se expresan específicamente en ciertos tipos de cáncer y se detectan circulantes en fluidos corporales como la sangre y/o la orina(400,447,463). Los lncRNAs son una nueva clase de biomarcadores y potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer. La siguiente tabla (**tabla 10**) representa los principales lncRNAs y sus posibles aplicaciones como biomarcadores en múltiples subtipos de tumores(447).

Tabla 10. Representación gráfica de los principales lncRNAs que se han relacionado con los diferentes subtipos tumorales(447).

Tipo tumoral	lncRNA	Potencial aplicación
Cáncer de próstata	PCA3, LincRNA-p21, PCAT-18, MALAT1, PVT1, TRPM2	Pronóstico, recurrencia, metástasis, estadificación, agresividad, detección precoz.
Cáncer de mama	ZFAS, HOTAIR, RP11-445H22.4, HIF1A-AS2, AK124454	Detección, recurrencia.
Cáncer de pulmón	MALAT1, SPRY4-IT1, ANRIL, NEAT1, UCA1	Detección precoz, detección.
Cáncer colorrectal	HOTAIR, CCAT1, CCAT2, FER1L4, XLOX_006844, LOC152578, XLOC_000303	Detección, recurrencia, metástasis.
Hepatocarcinoma	HOTAIR, uc001ncr, AX800134, HULC, HEIH	Recurrencia tras trasplante hepático, detección, metástasis, pronóstico.
Leucemia	UCA1, H19, HOTAIR	Identificación de subtipos de leucemia aguda.
Cáncer de vejiga	CRNDE	Detección, diagnóstico precoz, SG.
Cáncer de ovario	NEAT1	Invasión, pronóstico.
Cáncer renal	LET, PVT1, PANDAR, PTENP1	Detección temprana.
Cáncer cervical	HOTAIR	Detección temprana, recurrencia.
Cáncer de esófago	POU3F3, HNF1A-AS1, SPRY4-IT1	Detección temprana.
Cáncer gástrico	H19, CUDR, LSINCT-5, PTENP1, LINC00152	Detección temprana, pronóstico, detección, diagnóstico temprano.

1.2.3.4. LncRNAs y CR

Las funciones de los lncRNAs en cáncer de colon y recto incluyen el splicing, degradación, transcripción y traducción de ARN(464). Además, pueden regular la migración, invasión y

proliferación de las células actuando sobre los miRNAs de forma competitiva o uniéndose a estos(465). Están implicados en la carcinogénesis colorrectal actuando como oncogenes o genes supresores de tumores, así como interactuando con el ADN, el ARN y las proteínas(466). Podríamos destacar su la participación en la resistencia a la quimioterapia o la radioterapia en este tipo tumoral a través de varios mecanismos, como la modificación epigenética o la interacción con otros miRNAs, regulando la expresión de varios genes involucrados en procesos celulares clave como la invasión y la formación de metástasis, la apoptosis, y la proliferación y diferenciación celular(467). Incluso se pueden encontrar en sangre periférica (suero y plasma), como hemos destacado para los miRNAs y pudiendo ser unos buenos biomarcadores de biopsia líquida(464). En las células y tejidos del CCR, algunos lncRNAs tienden a sobreexpresarse y se asocian con un mal pronóstico y la formación de metástasis en los pacientes con CCR(468,469).

Podemos destacar algunos de los lncRNAs que tienen un papel más importante en tumores de colon y recto. Es importante tener en cuenta que la gran mayoría de estudios se han realizado con muestras de tumores colorrectales y no en concreto de tumores rectales únicamente. Por ejemplo, HOTAIR (que interactúa con PRC2(470), altera la epigenética celular y la expresión génica(464)) se sobreexpresa en las células epiteliales tumorales, lo que conduce a la metilación de las histonas y la invasión tumoral(471). Además, su expresión está estrechamente asociada con varias proteínas, como la vimentina, la metaloproteínasa de la matriz extracelular y la E-cadherina, que están involucradas en la invasión, la formación de metástasis, el estadio tumoral y la angiogénesis del CCR(472). Un estudio en muestras de sangre y tejidos de CCR demostró que la sobreexpresión de HOTAIR se correlaciona con una alta tasa de mortalidad(471). Otro ejemplo en tejidos y células de CCR es MALAT1 que promueve la proliferación, invasión, migración y metástasis de ganglios linfáticos de células cancerosas al activar AKAP-9(473). MALAT1 mejora la expresión de AKAP-9 al promover la expresión de SRPK1 y fosforilando SRSF1 en células CCR(474). Otro lncRNA, el transcrito 1 asociado con el cáncer de colon (CCAT1), está regulado al alza en todos los estadios de adenomas y adenocarcinomas colorrectales(468). En concreto, CCAT1 tiene un papel oncogénico en la activación de MYC en tejidos de CCR, promueve la proliferación e invasión celular al unirse directamente a la región promotora miR-155(469). Por otro lado, CCAT2 (Colon cancer-associated transcript 2) interactúa directamente con el factor de

transcripción 7-like 2 y provoca una regulación positiva en la expresión de MYC, que regula miR-17p y miR-20a, esto conduce a la inestabilidad genómica y promueve la metástasis(466,475). UCA1 está regulado al alza en los tejidos de CCR y desempeña un papel en la promoción de la proliferación celular al aumentar la carcinogénesis e inhibir la apoptosis(476). Es interesante destacar que la proteína de *CRNDE* se sobreexpresa diferencialmente en un 90 % en los tejidos CCR(477). La variante de transcripción 1 (*CRNDE-h*) se expresa en gran medida en los tejidos de CCR y su elevación se ha correlacionado con el tamaño tumoral, formación de metástasis a distancia y en ganglios linfáticos, y una menor SG(478). Además, Han *et al.* observaron que la eliminación de *CRNDE* y miR-181a-5p dio como resultado una inhibición de la proliferación celular y una reducción de la resistencia a la quimioterapia a través de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina(479). Otro lncRNA, H19, regula proteínas de la familia de la ubiquitina ligasa E3 o del supresor de tumores de retinoblastoma(480). La regulación positiva de H19 en tejidos CCR está implicada en una diferenciación deficiente y tumores más avanzados(481). Finalmente, se ha encontrado que el supresor tumoral GAS5 está regulado a la baja en el CCR, y sus bajos niveles se han asociado con una enfermedad más avanzada gracias a su capacidad para unirse al receptor de glucocorticoides, la desregulación del metabolismo y la supervivencia celular(482,483).

1.2.4. *LincRNA-p21*

Entre los más de 100.000 lncRNAs (LNCipedia 2.0) que se han descrito, lincRNA-p21 (ARN no codificante intergénico largo p21) es uno de los mejor caracterizados(401,445). LincRNA-p21 se localiza en el cromosoma 6p21.2, en la vía ascendente del gen regulador del ciclo celular p21/Cdkn1a, se describió por primera vez como un inductor de la apoptosis dependiente de p53 en fibroblastos embrionarios de ratón(446). LincRNA-p21 tiene dos isoformas que contienen un solo exón y elementos repetidos invertidos Alu(484). También es denominado TRP53COR1 (tumor de proteína P53 Pathway Corepressor 1) y diversos estudios han podido demostrar que tiene una función importante en el inicio y el progreso de varios tipos de tumores.

LincRNA-p21 suprime la expresión de proteínas como p53 al dirigirse a los ARN mensajeros

o al reclutar proteínas de unión a la cromatina(485), ya que contiene varias partes que interactúan con los ARN mensajeros diana, diferentes miRNAs y las proteínas de unión al ARN(486). Además, se ha demostrado que lincRNA-p21 está involucrado en el desarrollo de diferentes tumores a través de las principales vías de la carcinogénesis. En consecuencia, la sobreexpresión de lincRNA-p21 puede suprimir la invasión tumoral por la vía Notch(487). Además, suprime la progresión del cáncer de próstata mediante la inducción de la apoptosis y el control de la expresión génica aguas abajo de p53(488). De hecho, juega un papel importante como moderador en diferentes procesos biológicos, como la respuesta al daño del ADN, la apoptosis y la proliferación celular(489). De igual modo, lincRNA-p21 es inducido por la respuesta al daño del ADN; luego, lincRNA-p21 recluta hnRNP-K (ribonucleoproteína K nuclear heterogénea) en el promotor de p21, que es crucial para la interacción entre los promotores de p53 y p21 y, finalmente, potencia la expresión de p21(485). Los estudios *in vivo* e *in vitro* sobre cáncer han resaltado la función supresora de tumores de lincRNA-p21 en diferentes tipos tumorales(488,490–492). Varios estudios han demostrado que lincRNA-p21 se encuentra reducido en múltiples tipos de cáncer, como el cáncer gástrico(493), la leucemia linfocítica crónica(494), el carcinoma hepatocelular(487), el cáncer de pulmón de células no pequeñas(495), el cáncer o el cáncer de próstata(488). Más allá de su función reguladora, lincRNA-p21 se ha detectado en fluidos corporales como sangre, suero, plasma y orina; por lo tanto, podría sugerirse como un biomarcador potencial para cáncer (496).

1.2.4.1. Mecanismos de acción y procesos celulares con participación de lincRNA-p21

Desarrollaremos a continuación los principales procesos biológicos del cáncer en los que se ve implicado lincRNA-p21:

1- Apoptosis, proliferación celular y ciclo celular

Una de las principales características de lincRNA-p21 es que es un importante regulador de la apoptosis y la proliferación celular mediante la señalización de *p53* e inhibiendo la traducción del gen diana. Se ha podido demostrar que lincRNA-p21 con *p53* pueden controlar el número de genes reguladores de la apoptosis y la proliferación celular(497). En este mismo estudio, los autores observaron que la supresión de lincRNA-p21 y *p53* conducen a la inhibición de genes de apoptosis como *Perp* y *Noxa*, así como a la

activación de genes de supervivencia celular como *Stat3*, *Atf2* y *Bcl2l3*(497). Además, la sobreexpresión de lincRNA-p21 da como resultado la apoptosis celular después de la inducción del daño en el ADN(497). En este sentido, otro grupo reportó que lincRNA-p21 interactúa con *MDM2*, liberando así p53 de MDM2, y permitiendo que p53 se una a p300, lo que resulta en un aumento de la actividad de p53(498). Además, otro estudio demostró que la inducción de apoptosis por *ING1b* depende de la expresión de lincRNA-p21(499). En consecuencia, con un impacto importante en la vía de p53. *ING1b* puede unirse al promotor lincRNA-p21 y también controla el nivel de expresión de lincRNA-p21. Además, es necesario para inducir lincRNA-p21 por p53(499). Por lo tanto, podemos concluir de esta información que lincRNA-p21 puede interactuar con las vías de señalización de p53 e *ING1b* (**figuras 14 y 15**). Es interesante destacar los resultados de Hall *et al.*, su estudio demostró que la regulación negativa de lincRNA-p21 suprime la apoptosis inducida por la radiación de rayos ultravioleta Tipo B (UVB) en queratinocitos de humanos y ratones, mientras que la expresión reducida de lincRNA-p21 no tiene impacto en la proliferación celular de los queratinocitos antes y después del tratamiento con UVB(491) (**figura 16**). Además, una mutación en un solo alelo *p53* bloquea la activación de la expresión de lincRNA-p21 inducida por UVB y luego inhibe la apoptosis; por tanto, este alelo puede ser prooncogénico en el cáncer de piel(491). Por el contrario, Yang *et al.* observaron que, la sobreexpresión de lincRNA-p21 inhibe la apoptosis, mientras que su eliminación aumenta la apoptosis en muestras de tejidos cáncer de pulmón de células no pequeñas(500). El impacto de lincRNA-p21 en la apoptosis en este estudio estuvo mediado por la regulación a la baja de PUMA, un modulador de apoptosis que se regula al alza por *p53*(500,501). De hecho, PUMA es un factor proapoptótico que reprime algunos de los factores de transcripción antiapoptóticos como *Mcl-1*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W* y *AI*(502,503).

Es importante destacar el papel de lincRNA-p21 en el ciclo celular. La regulación a la baja de lincRNA-p21 se ha demostrado que participa en la suspensión del ciclo celular y disminuye la apoptosis(504). Por ejemplo, la regulación al alza de lincRNA-p21 ha demostrado una detención de G1 en células HN6 y Cal27, así como la reducción de los niveles de expresión de varios factores reguladores del ciclo celular, como la ciclina B1 y la ciclina D1, junto con la inducción de la apoptosis en el carcinoma de células

escamosas de cabeza y cuello(490). Asimismo, lincRNA-p21 puede disminuir la expresión de *HIF-1α*, reducir los niveles de *VEGF*, prevenir la proliferación e invasión celular y finalmente aumentar la apoptosis de las células de hepatocarcinoma MHCC97H(505). Del mismo modo, el aumento de la expresión de lincRNA-p21 suprime la invasión, la transición del ciclo celular desde G1, la proliferación celular y la migración, y también activa la apoptosis de la línea celular de cáncer de esófago a través del aumento de la expresión de p21 y reducción de la expresión de ciclina D(504). Por tanto, podríamos concluir que silenciar lincRNA-p21 conduce a niveles reducidos de p21, reordenamiento del estado de cromatina de algunos genes diana del complejo polycomb, disminución de la eficiencia de G1/S y aumento de proliferación celular(485). Es importante destacar el control de lincRNA-p21 sobre la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la supresión de lincRNA-p21 aumenta la proliferación celular mediada por esta ruta(506).

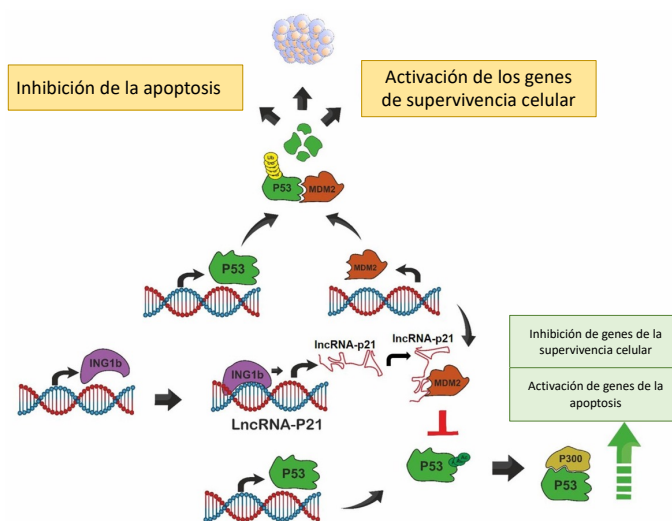


Figura 14. Representación gráfica de las principales vías de actuación de lincRNA-p21 en la apoptosis y la proliferación celular(507).

2- Metabolismo

Las células tumorales presentan un fenotipo metabólico único al que denominamos efecto Warburg, se caracteriza por una glucólisis aumentada y una fosforilación oxidativa

reducida, incluso en presencia de oxígeno(508). En un ambiente tumoral es común tener hipoxia, lo que provoca un aumento de la glucólisis(508). HIF-1 es un factor de transcripción con un papel mediador clave de la respuesta hipóxica, se trata de un heterodímero que incluye HIF-1 α como subunidad sensible al O₂ y HIF-1 β como subunidad expresada constitutivamente(509). En condiciones normóxicas, HIF-1 α se hidroxila en el residuo de prolino 402 y/o 564 por las proteínas del dominio prolina hidroxilasa(510). Hay que tener en cuenta que la proteína von Hippel-Lindau (VHL) actúa como una ubiquitina E3 ligasa que identifica la subunidad HIF-1 α tras la hidroxilación(511). Experimentos con diferentes líneas celulares han podido demostrar que, en condiciones hipóxicas, lincRNA-p21 está aumentado en comparación con situación de normoxia teniendo de esta forma un papel destacado en el efecto Warburg(512). LincRNA-p21 y HIF-1 α se unen competitivamente a VHL; es decir, cuando lincRNA-p21 aumenta, HIF-1 α se disocia del complejo VHL-HIF-1 α acumulándose y activando el efecto Warburg a través de la regulación al alza de la glucólisis y la regulación a la baja de la fosforilación oxidativa(512).

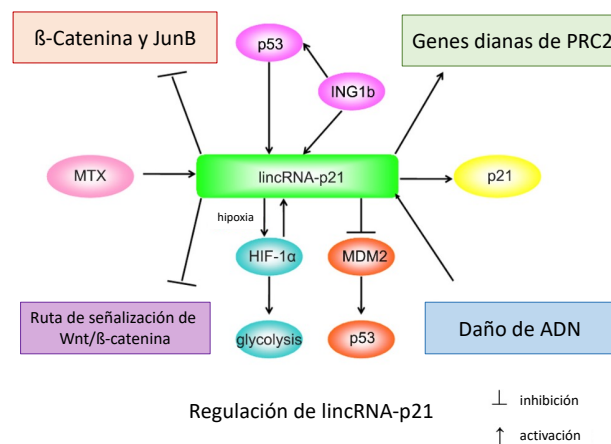


Figura 15. Representación gráfica de los mecanismos regulatorios de lincRNA-p21(513).

3- Tumorigénesis

Como hemos comentado en secciones anteriores, los lincRNA, incluido el lincRNA-p21, tienen una gran participación en la carcinogénesis. Sin embargo, el papel de lincRNA-p21 no está muy claro, ya que influye tanto a favor como en contra de este proceso. En concreto, lincRNA-p21 inhibe la traducción de β -catenina, conduciendo a la regulación negativa de los niveles de proteína de β -catenina presentando un papel supresor de la tumorigénesis(514). Sin embargo, su papel en el efecto Warburg nos sugiere un papel oncogénico(512). Otras de las dianas de lincRNA-p21 es *STAT3*, al que se une directamente inhibiéndolo de señales tumorigénicas. Es decir, la regulación a la baja de lincRNA-p21 reduce su interacción con *STAT3* aumentando su actividad transcripcional y, por tanto, la progresión tumoral(490,507). Además, hay estudios que indican que la baja expresión de lincRNA-p21 en las células madre cancerosas conduce a la activación de la tumorigénesis, mientras que una mayor expresión tiene un efecto contrario(515). Probablemente hay más estudios en favor de que lincRNA-p21 es un supresor de la carcinogénesis, aunque participe de forma indirecta en otros procesos que la favorezcan(504,516). Incluso hay estudios que sugieren que podría ser un biomarcador de cáncer(516).

4- Reprogramación celular

La reprogramación celular es uno de los procesos con un papel importante en la invasión celular y el desarrollo de metástasis, ya que permite a las células diferenciadas adquirir características de células pluripotentes(517–519). LincRNA-p21 puede bloquear la reprogramación celular somática mediante la metilación de CpG en los promotores de un subconjunto de genes como *Lin28a* y el mantenimiento de H3K9me3 en los promotores de genes de la pluripotencialidad como *Nanog*(393,520). Estos procesos vienen mediados por hnRNP-K, al que lincRNA-p21 se une directamente a lincRNA-p21(485,497).

5- Invasión y metástasis

La invasión tumoral y la metástasis son las principales causas de mortalidad por cáncer. Se produce cuando las células pierden la adhesión y rompen la matriz reticular para poder salir al torrente sanguíneo y depositarse en ciertos órganos o estructuras corporales donde crecerán posteriormente(521,522). En este proceso tiene un papel fundamental la

transición de las células perdiendo sus características epiteliales que le permiten conformar grupos celulares normales y estructurados hacia células mesenquimales con capacidad de invasión(523), proceso que se conoce con el nombre de transición epitelio-mesénquima (*epitelial mesechymal transition* en inglés, EMT), además, cuando las células se depositan para formar las metástasis tienen la capacidad de volver a adquirir características de células epiteliales(proceso inverso, MET)(518). Se ha podido estudiar la participación de lincRNA-p21 en este ámbito; por ejemplo, puede inhibir la invasión y la metástasis de cáncer gástrico, hepatocarcinoma o cáncer colorrectal. Un experimento llevado a cabo en líneas celulares de cáncer gástrico reportó que tras la pérdida de contacto de célula-célula, los niveles de vimentina y N-cadherina mejoran tras la desactivación de lincRNA-p21 mediante la vía Hippo y la activación de *YAP*(493). Además, se ha revelado que lincRNA-p21 activa la EMT en la vía descendente mediada por miRNAs(487), pero también se ha demostrado que el aumento de la expresión de lincRNA-p21 puede suprimir la EMT a través de la vía de Notch(524). En este sentido, lincRNA-p21 regula negativamente miRNA-9, que a su vez regula negativamente la *E-cadherina* y la adhesión celular(524). Por lo tanto, lincRNA-p21 podría reprimir el desarrollo del hepatocarcinoma a través de la vía de señalización miR-9/E-cadherina(487). Por otro lado, la regulación positiva de lincRNA-p21 ha dado como resultado la disminución de las proteasas MMP2 y MMP9 de la matriz, y viceversa(507); otro de los actores fundamentales en la desestructuración de la matriz como paso previo a la invasión celular(525).

6- Angiogénesis

La angiogénesis es un factor clave en el crecimiento del tumor y la metástasis. La angiogénesis activa la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos existentes gracias, entre otros, a los factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o la hipoxia(526,527). Existen diferentes vías de señalización y moléculas para la inducción de la angiogénesis entre las que se encuentran los lincRNAs(528). Por ejemplo, en un estudio muy interesante, Castellano *et al.* encontraron que lincRNA-p21 desempeñaba un papel pronóstico en cáncer de pulmón de células no pequeñas a través del control de la angiogénesis(495). En este sentido, observaron que, la regulación a la baja de lincRNA-p21 en condiciones de hipoxia provoca una reducción

en la expresión de genes relacionados con la angiogénesis (*MMP2*, *PDGFB*, *VEGFA*, *FGF2*, *granulina* y *EDIL3*)(495). Estos genes están implicados en varios procesos, como la degradación de la matriz extracelular, la metástasis, la formación de células endoteliales, la angiogénesis y la motilidad celular. El aumento de los niveles de lincRNA-p21 en las células tumorales de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas se relacionó con una mayor densidad microvascular(495).

7- Vías de señalización

Además, vale la pena mencionar de forma resumida que lincRNA-p21 participa en la regulación de algunas vías de señalización importantes en la proliferación celular, el crecimiento celular, el ciclo celular, la apoptosis y la metástasis, incluidas Wnt/ β -catenina(506), miR-9/E-cadherina(487), señalización de Notch(507,524), JAK2/STAT3(490,507) y AKT/mTOR(507,529). En este sentido, Wang *et al.* descubrió que la eliminación de lincRNA-p21 conduce a una mayor expresión de PKM2, así como a la activación de la señalización de AKT o mTOR(529). La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR tiene una función importante en la progresión del cáncer, como el cáncer de próstata(529). De manera similar, la alta expresión de lincRNA-p21 inhibe la vía Wnt/ β -catenina y, como se demostró en un estudio, inactiva las células estrelladas hepáticas a través del impacto de miR-17-5p sobre el factor inhibidor 1 de Wnt (WIF1)(530). Es importante destacar que además se ha demostrado que lincRNA-p21 potencia la respuesta a la radioterapia para el CCR mediante la inhibición de la vía de señalización de la β -catenina y el aumento de la expresión de *Noxa*, como gen pro-apoptótico(531). LincRNA-p21 actúa a través de miR-181b para mejorar las expresiones de activación de PTEN (vía de señalización lincRNA-p21-miR-181b-PTEN)(532).

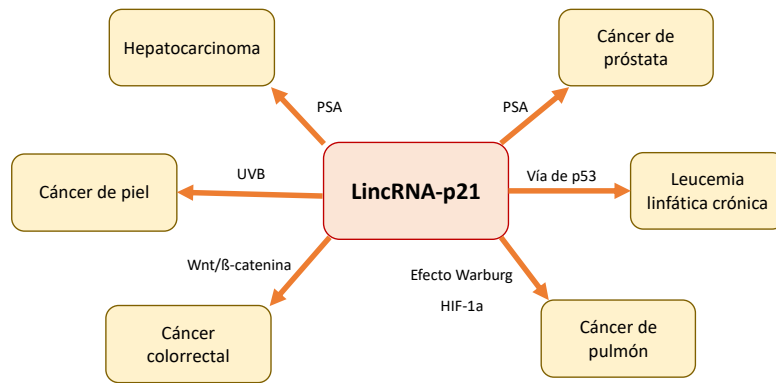


Figura 16. Representación gráfica de los principales mecanismos de lincRNA-p21 en cáncer(513).

1.2.4.2. Relación entre lincRNA-p21 y miRNAs

Es interesante saber que los lncRNAs tienen una interacción con otros ARNs, incluidos los miRNAs a través del emparejamiento de bases de ácido nucleico, la interacción lncRNA-ARN mensajero conduce a la competencia entre ambos por unirse a los miRNAs (**figura 17**). Por ejemplo, se ha demostrado que lincRNA-p21 podría inhibir la vía Wnt/ β -catenina mediante su unión a miR-17-5p en células estrelladas hepáticas(530). Además, lincRNA-p21 tiene capacidad para unirse a miR-1277-5p y regular el nivel de expresión de miR-1277-5p, *in vitro*. La regulación positiva de miR-1277-5p inhibe el impacto de lincRNA-p21 en la apoptosis y la viabilidad celular(533).

Los mecanismos de regulación cruzada entre lncRNAs y miRNAs se pueden dar a través de varios mecanismos postranscripcionales.

A- Los **miRNAs reducen la estabilidad de los lncRNAs**, lo que resulta en la modulación de la cantidad de lncRNAs disponibles y afecta de esta forma a diferentes procesos celulares(534). Por ejemplo, la unión de HuR, una proteína de unión a ARN, a lincRNA-p21 produce el reclutamiento de let-7/Ago2 a lincRNA-p21 y a la disminución de la estabilidad de lincRNA-p21. De hecho, la sobreexpresión de let-7b activa la degradación del ARN que codifica lincRNA-p21 en células HeLa de carcinoma de cuello uterino humano(514).

B- Los **lncRNA también pueden secuestrar miRNAs** lejos de sus ARN mensajero

diana. Estos lncRNAs se conocen como "esponjas" o "señuelos" de miRNAs, y su función es reducir la cantidad de miRNAs disponibles y aumentar la traducción a proteínas de sus ARN mensajeros(534). En concreto, lncRNA-p21 puede atrapar a miR-451 para activar la apoptosis(535).

C- Los **lncRNAs también pueden competir directamente con los miRNAs** por la unión a sus ARN mensajeros diana eliminando la regulación que ejercen los miRNAs sobre la traducción de los ARN(534).

D- Por último, es interesante saber que algunos **lncRNAs podrían generar miRNAs** a partir de sus propias regiones intrónicas y exónicas(536).

En conjunto, lincRNA-p21 no solo puede unirse a los miRNAs directamente, como esponjas o cebos de los miRNAs para modular sus funciones, sino que también puede ser el objetivo de diferentes miRNAs que regulan su expresión y su función.

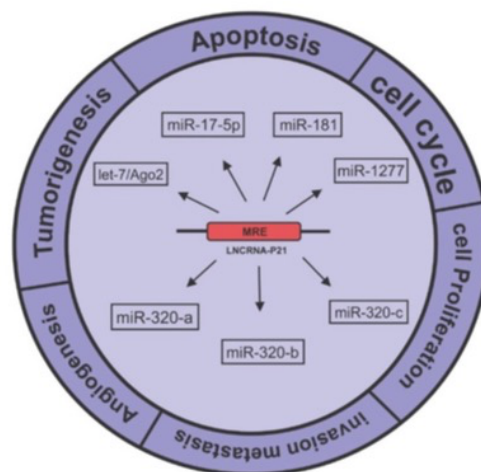


Figura 17. Representación gráfica de los principales miRNAs identificados con los que lincRNA-p21 puede interactuar en las diferentes vías biológicas celulares(507).

1.2.4.3. LincRNA-p21 y cáncer

Como hemos visto anteriormente lincRNA-p21 está implicado en el desarrollo y progresión de diferentes enfermedades humanas, pero particularmente en el cáncer. LincRNA-p21 es muy sensible a la hipoxia y desempeña un papel fundamental en la regulación del efecto Warburg mediante la regulación de la vía HIF-1 α (ver sección 1.2.4.1). El lincRNA-p21

inducido por HIF-1 α puede unirse a HIF-1 α y VHL e interrumpir la interacción VHL-HIF-1 α (512). Además, lincRNA-p21 a su vez estabiliza HIF-1 α , formando así un circuito de retroalimentación positiva para asegurar la expresión de HIF-1 α inducida por hipoxia en condiciones hipóxicas(512) (**Figura 15**). El eje HIF-1 α -lincRNA-p21 facilita la tumorigénesis, por lo que lincRNA-p21 tiene un papel destacado en cáncer.

Otra vía en la que lincRNA-p21 tiene un papel importante es la vía de señalización Wnt/ β -catenina, con gran participación en la carcinogénesis del CCR y en la sensibilidad de los tumores a la radioterapia (ver sección 1.2.4.4). LincRNA-p21 puede inhibir la vía de señalización de Wnt/ β -catenina mediante la reducción de la expresión de genes diana de β -catenina, como *c-myc* y *ciclina D1*(531).

Pero lincRNA-p21 también está asociado con tumores de piel, cáncer de próstata y leucemia linfocítica crónica(516,537–539). LincRNA-p21 regulado a la baja puede favorecer la hiperproliferación de queratinocitos y luego promover la formación de tumores de piel en modelos *in vivo* murino sin expresión de VDR(538). Además, lincRNA-p21 promueve la apoptosis inducida por UVB en queratinocitos humanos y de ratón(491). La mutación de un único alelo de *p53* inhibe el efecto sobre la expresión de lincRNA-p21 inducida por UVB evadiendo la apoptosis inducida por UVB, lo que nos muestra su función prooncogénica en el desarrollo del cáncer de piel(491).

Los lncRNAs a menudo muestran una expresión específica de tejido o de una enfermedad, pudiendo considerarlos como potenciales biomarcadores. Un buen ejemplo es el estudio de Isin *et al.*, los autores encontraron que el lincRNA-p21 exosómico puede actuar como un biomarcador de estabilidad y diagnóstico no invasivo para la detección del cáncer de próstata(539). Además, lincRNA-p21 está significativamente regulado a la baja en pacientes con LLC(497), la disminución del nivel de lincRNA-p21 en plasma se correlaciona con el estadio de la enfermedad(516). En este contexto, podemos hablar también del papel de lincRNA-p21 como biomarcador en cáncer de pulmón. Se ha relacionado los niveles de lincRNA-p21 con el pronóstico en cáncer de pulmón de células no pequeñas a través de su influencia en las vías de la angiogénesis(495). Este mismo grupo demostró en otro estudio resultados en este sentido. Niveles altos de lincRNA-p21 en exosomas detectados en la sangre de la vena de drenaje del tumor durante su resección, se asociaron con un peor

pronóstico en términos de SG y tiempo a la recaída. Los exosomas derivados de tumores enriquecidos en lincRNA-p21 afectan a las células endoteliales al promover la formación de microvascularización y mejorar la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales. Por tanto, las vesículas extracelulares ricas en lincRNA-p21 podrían ser un nuevo marcador pronóstico en pacientes con tumores pulmonares resecaados, al promover la angiogénesis y la formación de metástasis(540).

1.2.4.4. LincRNA-p21 y CCR

No hay mucha información ni estudios realizados con lincRNA-p21 en CR. Sin embargo, si hay evidencia de forma más global en tumores colorrectales, incluyendo muestras de CR. El nivel de expresión de lincRNA-p21 se ha encontrado más bajo en tejido de CCR y en las líneas celulares de CCR humano, lo que sugiere que lincRNA-p21 puede funcionar como un potencial supresor de tumores(541). LincRNA-p21 inhibe la traducción de sus genes diana a través de la combinación con el ARN mensajero de los mismos, uno estos genes diana es *JunB*, un importante activador transcripcional(497). Se ha demostrado que *JunB* promueve la progresión del ciclo celular y la transformación tumorigénica(542,543). *CTNNB1* es otro de las dianas de lincRNA-p21(514). Tanto *JunB* como *CTNNB1* participan en la regulación de la progresión del CCR(544). Podemos destacar dos estudios que destacan a lincRNA-p21 como un importante actor en el pronóstico y en la sensibilidad a la radioterapia de los tumores colorrectales. Zhai y colaboradores, encontraron que lincRNA-p21 se expresa de forma anómala en el CCR y que su nivel se asocia con el estadio del tumor y la invasión del tejido tumoral(545). Además, lincRNA-p21 puede promover la sensibilidad a la radioterapia de tumores colorrectales a través de la supresión de la vía de señalización de la β -catenina y la elevación de la expresión del gen pro-apoptosis *Noxa*(531,545). La vía de señalización Wnt/ β -catenina es fundamental en el inicio y la progresión del CCR, la activación aberrante de la β -catenina está relacionada con malos resultados del tratamiento este tipo tumoral(546–548). LincRNA-p21 puede inhibir la vía de señalización de Wnt/ β -catenina mediante la reducción de la expresión de genes diana de β -catenina, como *c-myc* y *ciclina D1*(531). Por lo tanto, lincRNA-p21 no solo profundiza nuestra comprensión del mecanismo de carcinogénesis del CCR, sino que también ofrece un objetivo potencial para la radioterapia del CCR.

Además del estudio que presentamos en esta tesis doctoral, se ha realizado otro estudio español que analizó el valor clínico de lincRNA-p21 en 177 pacientes con CR y CC en estadios I-III resecados. Se analizaron muestras de tejido y plasma apareadas de tejidos normal y tumoral y de sangre drenada en venas mesentéricas de tumores y venas periféricas de personas sanas. LincRNA-p21 se encontró regulado a la baja en tejido tumoral frente a tejido normal ($p = 0,0012$). Los pacientes con alta expresión de lincRNA-p21 tuvieron un peor pronóstico en términos de recaída y SG. Es de destacar que el mayor impacto pronóstico se observó en el subgrupo de pacientes con cáncer de recto donde los pacientes con niveles altos de lincRNA-p21 presentaron peor SLE ($p = 0,0226$) y SG ($p = 0,0457$). Curiosamente, los pacientes con cáncer de recto con lincRNA-p21 alto se beneficiaron más de la QRT postoperatoria. Finalmente, los autores analizaron lincRNA-p21 como biomarcador en sangre. Los pacientes con niveles elevados de lincRNA-p21 en la vena mesentérica tenían una enfermedad más avanzada y una peor evolución. Por tanto, los niveles de lincRNA-p21 plasmático podría ser un biomarcador prometedor en biopsias líquidas de CR(549).

HIPÓTESIS

La QRT preoperatoria es un tratamiento estándar para los pacientes con CR localmente avanzado, pero su uso en pacientes que no responden puede asociarse con un aumento de la toxicidad y el retraso de la resección. La identificación de biomarcadores de respuesta a la QRT en muestras de biopsia obtenidas previo al inicio del tratamiento podría mejorar el manejo de estos pacientes. En este contexto, los ncRNA, que están demostrando ser biomarcadores con un papel muy importante en la regulación génica, podrían ser buenos candidatos de estudio. Entre ellos, los miRNA son los más conocidos y estudiados hasta la fecha y se ha demostrado que influyen en la regulación de los genes implicados en la carcinogénesis, pero han sido poco estudiados en muestra de biopsia pre-QRT. Por otro lado, lincRNA-p21 es un ARN no codificante de cadena larga involucrado en la vía p53, por lo que sospechamos que podría ser un buen biomarcador de predicción de respuesta a tratamiento. En base a todo esto hipotetizamos que el estudio del perfil de expresión de miRNAs y de lincRNA-p21 pueden permitirnos identificar biomarcadores de respuesta a la QRT que permitan mejorar el manejo de los pacientes con tumores de recto localmente avanzados para optimizar su manejo clínico.

OBJETIVOS

En base a esta hipótesis nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- A) Identificar un perfil de miRNAs en muestra de biopsia pre-tratamiento que permita identificar aquellos pacientes diagnosticados de un tumor de recto localmente avanzado con necesidad de quimio-radioterapia preoperatoria y que puedan tener un beneficio de dicho tratamiento.

- B) Analizar sí la expresión de lincRNA-p21 en muestra de biopsia pre-tratamiento pueden actuar como un biomarcador predictivo de la respuesta a quimio-radioterapia neoadyuvante en pacientes diagnosticados de tumores de recto localmente avanzado.

**MATERIAL Y MÉTODOS,
RESULTADOS**

1.3. Primera parte: firma de miRNAs como biomarcadores de respuesta a tratamiento neoadyuvante del CRLA

1.3.1. Resumen del artículo 1

La QRT preoperatoria es un tratamiento estándar para pacientes con CRLA. A pesar de los beneficios de la QRT, su uso en pacientes que no responden puede asociarse con un aumento de la toxicidad y el retraso de la resección quirúrgica. La identificación de biomarcadores de respuesta a la QRT, como los miRNAs, podría mejorar el manejo de estos pacientes. Hemos estudiado la expresión de miRNAs en biopsias de endoscopia antes del tratamiento de pacientes con CR tratados con QRT para identificar posibles miRNAs capaces de predecir la respuesta y el pronóstico de estos pacientes. Se purificó ARN de tejido procedente de biopsias endoscópicas pretratamiento de 96 pacientes con CR tratados con QRT preoperatoria. La respuesta patológica se clasificó según la clasificación de Dworak del grado de regresión tumoral. En la fase de cribado, se estudiaron 377 miRNAs en 12 pacientes con respuestas extremas (TRG0-1 vs TRG4). El papel potencial como biomarcadores predictivos de la respuesta a la QRT, la SLE y la SG de los miRNAs identificados en la fase de detección se validó en toda la cohorte.

En la fase de cribado, se identificó una firma de respuesta a la QRT formada por 8 miRNAs: let-7b, let-7e, miR-21, miR-99b, miR-183, miR-328, miR-375 y miR-483-5p. En la fase de validación, miR-21, miR-99b y miR-375 se validaron como miRNAs relacionados con la respuesta al tratamiento preoperatorio con QRT, al demostrarse que niveles bajos en muestras preoperatorias de estos miRNAs se observaban en tumores que después demostraron una respuesta completa al tratamiento. Por otro lado, miR-328 y let-7e surgieron como marcadores de mal pronóstico cuando se encontraban en niveles bajos, en concreto ambos demostraron una peor SLE en comparación con los tumores con alta expresión y let-7e además se relacionó con una peor SG cuando se encontraba en niveles bajos. El análisis de la curva ROC mostró que la combinación de miR-21, miR-99b y miR-375 tenía la mejor capacidad para distinguir a los pacientes con la mejor respuesta (TRG4) del resto. En conclusión, miR-21, miR-99b y miR-375 ayudan a individualizar el tratamiento en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.

Artículo 1: Marc Campayo, Alfons Navarro, **José Carlos Benítez**, Sandra Santasusagna, Carme Ferrer, Mariano Monzo, Luis Cirera. MiR-21, miR-99b and miR-375 combination as predictive response signature for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. PLoS One. 2018;13(11). doi:10.1371/journal.pone.0206542

1.4. Segunda parte: LincRNA-p21 como biomarcador predictivo y pronóstico de respuesta a QRT en CRLA

1.4.1. Resumen artículo 2

LincRNA-p21 es un ARN no codificante de cadena larga involucrado en la vía p53 y la regulación de la angiogénesis. Nuestro objetivo fue estudiar si los niveles de expresión de lincRNA-p21 pueden actuar como un biomarcador predictivo para la respuesta de QRT neoadyuvante. Analizamos los ARN de biopsias previas al tratamiento de 70 pacientes con CR tratados con QRT preoperatoria. La respuesta patológica se clasificó según la clasificación de Dworak del grado de regresión tumoral. La expresión de LincRNA-p21 se determinó mediante RTqPCR. Los resultados mostraron que el lincRNA-p21 estaba regulado al alza en los tumores en estadio III ($p = 0,007$) y en los tumores con la peor respuesta con respecto al TRG ($p = 0,027$) y aquellos en los que se logró disminuir el estadio tumoral con el tratamiento neoadyuvante ($p = 0,016$). El análisis de la curva ROC mostró que la expresión de lincRNA-p21 tiene la capacidad de distinguir una respuesta completa de otras (AUC: 0,696; $p = 0,014$). LincRNA-p21 se mostró como un marcador independiente de la respuesta QRT preoperatoria ($p = 0,047$) y del tiempo hasta la recaída (TTR) ($p = 0,048$) al encontrarse sobreexpresado en aquellos tumores que mostraron enfermedad avanzada, peor respuesta a la QRT neoadyuvante y un TTR más corto y, por tanto, el estudio de lincRNA-p21 puede ayudar en la individualización del tratamiento con QRT preoperatoria en CR.

Artículo 2: **Jose Carlos Benítez**, Marc Campayo, Tania Díaz, Carme Ferrer, Melissa Acosta-Plasencia, Mariano Monzo, Luis Cirera, Benjamin Besse, Alfons Navarro. Personalized Medicine Lincp21-RNA as Predictive Response Marker for Preoperative Chemoradiotherapy in Rectal Cancer. Journal of Personalized Medicine. 2021;11(5):420. doi:10.3390/jpm11050420.

RESEARCH ARTICLE

miR-21, miR-99b and miR-375 combination as predictive response signature for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer

Marc Campayo¹*, Alfons Navarro², Jose Carlos Benítez¹, Sandra Santasusagna², Carme Ferrer³, Mariano Monzó², Luis Cirera¹

1 Department of Medical Oncology, Hospital Universitari Mutua Terrassa, University of Barcelona, Terrassa, Barcelona, Spain, **2** Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain, **3** Department of Pathology, Hospital Universitari Mutua Terrassa, University of Barcelona, Terrassa, Barcelona, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* mcampayo@mutuaterrassa.es



OPEN ACCESS

Citation: Campayo M, Navarro A, Benítez JC, Santasusagna S, Ferrer C, Monzó M, et al. (2018) miR-21, miR-99b and miR-375 combination as predictive response signature for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. PLoS ONE 13 (11): e0206542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206542>

Editor: Bernard Mari, Institut de Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire, FRANCE

Received: July 4, 2018

Accepted: October 15, 2018

Published: November 2, 2018

Copyright: © 2018 Campayo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Funding: This work was supported by grants from AECC-Catalunya 2017 (AN), SAF2017-88606-P (AN) from the Ministry of the Economy and Competition (MINECO) co-financed with the European Union FEDER funds and SDCSD from the Universitat de Barcelona (MM). SS is an APIF fellows of the Universitat de Barcelona.

Abstract

Introduction

Preoperative chemoradiotherapy (CRT) is a standard treatment for locally advanced rectal cancer patients. Despite the benefits of CRT, its use in non-responder patients can be associated with increased toxicities and surgical resection delay. The identification of CRT response biomarkers, such as microRNAs, could improve the management of these patients. We have studied the microRNA expression in pretreatment endoscopy biopsies from rectal cancer patients treated with CRT to identify potential microRNAs able to predict CRT response and clinical outcome of these patients.

Material and methods

RNA from pretreatment endoscopy biopsies from 96 rectal cancer patients treated with preoperative CRT were studied. Pathological response was graded according to the tumor regression grade (TRG) Dworak classification. In the screening phase, 377 miRNAs were studied in 12 patients with extreme responses (TRG0-1 vs TRG4). The potential role as predictive biomarkers for CRT response, disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) of the miRNAs identified in the screening phase were validated in the whole cohort.

Results

In the screening phase, an 8-miRNAs CRT-response signature was identified: let-7b, let-7e, miR-21, miR-99b, miR-183, miR-328, miR-375 and miR-483-5p. In the validation phase, miR-21, miR-99b and miR-375 emerged as CRT response-related miRNAs while miR-328 and let-7e emerged as prognostic markers for DFS and OS. Interestingly, ROC curve analysis showed that the combination of miR-21, miR-99b and miR-375 had the best capacity to distinguish patients with maximum response (TRG4) from others.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions

miR-21, miR-99b and miR-375 could add valuable information for individualizing treatment in locally advanced rectal cancer patients.

Introduction

Rectal cancer accounts for approximately one-third of all colorectal tumors, which is one of the leading causes of cancer death in the world[1]. Preoperative chemoradiotherapy (CRT) has been incorporated into common clinical practice for the treatment of locally advanced rectal cancers (T3-T4 or N+). The most frequently used chemotherapy agent is 5-Fluorouracil in combination with concurrent fractionation radiotherapy. Preoperative CRT has multiple advantages, including the higher radiosensitivity of tissues before surgery, the lower rate of toxicities and the higher probability of achieving sphincter preservation due to tumor down-staging[2]. Of note, the rate of pathological response after treatment has been associated with prognosis[2]. Pathological complete response (pCR; ypT0N0), which occurs in 15–25% of the patients, has been linked with lower rates of local recurrences. However, preoperative CRT has not been associated with better disease-free survival (DFS) or overall survival (OS) rates[3, 4]. In clinical practice, there are no validated biomarkers to correctly identify those patients that will not respond, so patient selection remains exclusively a clinically based decision.

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs that regulate post-transcriptional gene expression by binding primarily to the 3' untranslated region (UTR) of their target mRNA and repressing its translation[5]. miRNAs are aberrantly expressed and deregulated in cancer[6] where depending on their targets can act either as oncogenes or tumor suppressor genes[7]. Different profiles of miRNAs differentially expressed between rectal cancer and normal rectal tissue have been described[8]. These miRNAs target multiple genes involved in crucial pathways in tumor biology. Moreover, some miRNAs conforming the rectal cancer miRNAome are differentially expressed in colon cancer[9]. Several studies have shown the involvement of miRNAs in resistance to chemotherapy or CRT, both *in vitro* and *in vivo* studies[10–14]. Identifying patients who will not respond to treatment is crucial to avoid unnecessary treatment, potential toxicities and a delay of surgery. In this setting, miRNAs could serve as predictive biomarkers to select the most optimal treatment in each case in order to individualize therapy. Previous studies with a limited number of patients have proposed some miRNAs as predictors of response to preoperative CRT in rectal cancer[15–20].

In the present work, primarily we analyzed the miRNA profile in extreme responder vs non-responder patients to preoperative CRT for rectal cancer treated in our institution. miRNAs differentially expressed between responders and non-responders were studied in a larger series of patients of the same institution and correlated with treatment response and survival.

Material and methods

Study population

Ninety-six patients with a diagnosis of rectal adenocarcinoma in a clinical stage II or III (uT3-T4 and/or uN+) and consecutively treated in Hospital Universitari Mutua Terrassa were selected. All patients had received neoadjuvant chemotherapy with 5-Fluorouracil 225 mg/m²/day x 7 days in continuous infusion and in combination with pelvic locoregional radiotherapy (45–50 Gy). Six to 8 weeks after completion, all patients underwent surgery. All surgical

specimens were evaluated and classified according to TNM 7th edition and pathological response was graded according to the tumor regression grade (TRG) Dworak classification [21]. Approval for the study was obtained from the Institutional Review Board of the Hospital Universitari Mutua Terrassa, Barcelona, Spain.

RNA extraction

Total RNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues from pretreatment endoscopy biopsies using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) as per the manufacturer's protocol. The concentration of RNA was determined using the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

miRNA quantification

In the screening phase, 377 miRNAs were analyzed in 12 selected patients to identify miRNAs associated with response to neoadjuvant treatment. miRNA profiling was performed with TaqMan Array Human MicroRNA A Cards v2.0 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) using pre-amplification as previously described [22]. Expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Real-time quantitative PCR reactions were performed on an ABI 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Normalization was performed with RNU48, based on preliminary analyses comparing the stability of RNU48, RNU44 and MammU6; RNU48 had the lowest variability of expression in the miRNA expression patient data set and was therefore used in this study. All miRNAs that were expressed in less than 10% of samples or with an unreliable quantification were excluded from further analysis, leaving a set of 184 miRNAs.

In the validation phase, selected miRNAs identified in the screening phase were validated in the whole cohort of 96 patients by single Real Time TaqMan MicroRNA Assays in an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System as previously described [23].

Statistical methods

Data on miRNA expression were analyzed using TIGR Multiexperiment viewer version 4.0 software (The Institute for Genomic Research, and ArrayAssist software, Stratagene, <http://www.tm4.org/mev>), R software version 3.4 (The R Foundation for Statistical Computing c/o Institute for Statistics and Mathematics, Wirtschaftsuniversität Wien, <http://www.r-project.org/>) and SPSS v.15.0 (Chicago, IL, USA). Hierarchical clustering was performed using Pearson squared correlation and average linkage. To identify miRNAs with significant differential expression between response groups, two multivariate permutation tests were performed: significance analysis of microarrays (SAM) and Student's t-test based on multivariate permutation (with random variance model). Differences between miRNAs were considered statistically significant if the P-value was <0.001 (t-test) or false discovery rate <0.1% (SAM). ROC curves were calculated using R package pROC [24]. The multivariate analysis for treatment response was performed by using Binary Logistic regression.

The prognostic impact on DFS and OS, of the identified miRNAs was also evaluated. DFS and OS were defined as the time between surgery and either recurrence or death (DFS) or death from any cause (OS). Optimal cutoffs of miRNA expression data for DFS and OS were assessed by means of maximally selected log-rank statistics [25] using the Maxstat package (R statistical package, v. 2.8.1, Vienna, Austria). DFS and OS were calculated with the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. All prognostic variables in the univariate analysis with a P-value at or below 0.1 were included in the multivariate analysis performed

Table 1. Main clinical characteristics of the patients included in the study.

Characteristic		N = 96	DFS	OS	
Sex	Male	66 (69)	0.619	0.614	
	Female	30 (31)			
Median Age (range)	66 (38–84)				
	<60	29 (30)	0.154	0.564	
	>60	67 (70)			
Clinical stage pre CRT	II	14(15)	0.531	0.748	
	III	82 (85)			
Adjuvant therapy	No	40 (42)	0.237	0.346	
	Yes	5-FU			7 (7)
		FOLFOX			42 (44)
		Other			7 (7)
ypT	ypT0	26 (27)	0.010	0.033	
	ypT1-2	23 (24)			
	ypT3-4	47 (49)			
ypN	pN0	66 (69)	0.013	0.003	
	pN+	30 (31)			
Pathological stage	ypT0N0	24 (25)	0.047	0.044	
	ypI	20 (21)			
	ypII	20 (21)			
	ypIII	32 (33)			
Downstaging	No	35 (37)	0.002	0.001	
	Yes	61 (63)			
Tumor regression grade (TRG)	0–3	70 (72.9)	0.116	0.149	
	4	26 (27.1)			

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206542.t001>

using the stepwise proportional hazard Cox regression model. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Patient characteristics

Table 1 shows the main characteristics of the 96 patients included in the study. Sixty-six patients were male and 30 female. Their median age was 66 years (range 38–84 years). Fourteen (15%) patients had clinical stage II and 82 (85%) patients had clinical stage III. 58% of patients received adjuvant therapy after resection. 63% of patients had a downstaging of the disease after treatment, 25% had a pathological complete response (ypT0N0M0) and 27% had a TRG 4.

Screening phase: Identification of miRNAs related to tumor response

For the primary analyses of miRNA differentially expressed in extreme responders, we selected 6 patients with complete regression (TRG4: no tumor cells detectable in the resected primary tumor after chemoradiotherapy) and 6 patients without response or minor response (TRG 0–1).

Supervised analysis by SAM and t-test of 12 patients revealed 8 common miRNAs differentially expressed in the TRG4 samples compared to the TRG0-1 samples: let-7b, let-7e, miR-21, miR-99b, miR-183, miR-328, miR-375 and miR-483-5p (Fig 1A)

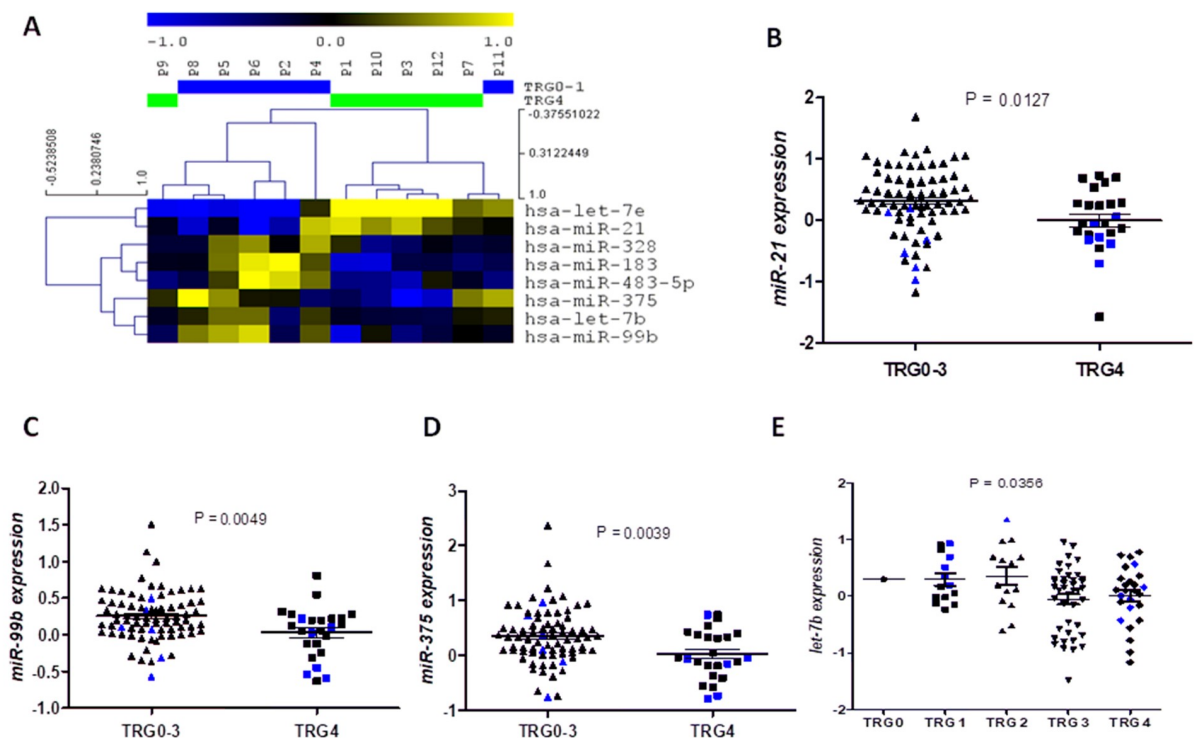


Fig 1. Identification of miRNAs related to treatment response. A) Hierarchical cluster analysis showing the 8 miRNAs identified differentially expressed in TRG4 vs TRG0-1 samples in the screening phase. B) miR-21, C) miR-99b, D) miR-375 and E) let-7e expression levels in the whole cohort according treatment response (TRG). The black bars in the scatter plots indicate mean \pm SEM, and in blue we have highlighted the values from the 12 samples included in the screening phase. TRG 0-3 group is composed of 70 patients, one TRG0, 14 TRG1, 14 TRG2 and 41 TRG3, while the TRG4 group is composed of 26 patients.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206542.g001>

Validation phase I: Analysis of tumor response-related miRNAs in the whole cohort

The eight miRNAs were studied in the whole cohort (S1 Table and S1 Data) to validate their potential value to predict response to neoadjuvant treatment. Interestingly, those patients who developed complete response (TRG4) had significantly lower miR-21 ($p = 0.0127$, Fig 1B), miR-99b ($p = 0.0049$, Fig 1C) and miR-375 expression levels ($p = 0.0039$, Fig 1D). Moreover, let-7b expression was progressively reduced from TRG0 to TRG4 (Pearson $r^2 = -0.241$, $p = 0.014$; ANOVA $p = 0.0356$, Fig 1E). No significant differences were observed for the other miRNAs.

Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to investigate the potential utility of miR-21, miR-99b and miR-375 as predictive biomarkers of response to neoadjuvant treatment. The area under the curve (AUC) value for miR-21, miR-99b and miR-375 was 0.6691 (95% confidence interval (CI) = 0.55–0.79; $p = 0.012$), 0.671 (95% CI = 0.55–0.79; $p = 0.01$) and 0.691 (95% CI = 0.57–0.81; $p = 0.0042$) respectively (Fig 2). In the optimum truncation point the sensitivity and specificity was 58.3% and 76.3% for miR-21 (<0.09), 60% and 62% for miR-99b (<0.15) and 60% and 76.6% for miR-375 (<0.07).

Interestingly, the combination of the 3 miRNAs (sum of their expression) improved the discrimination with an AUC value of 0.736 (95% confidence interval (95% CI) = 0.62–0.85; $p = 0.00043$) with 60% sensitivity and 82.9% specificity to distinguish patients with maximum response (TRG4) from others (Fig 2A). In order to compare the impact of the miRNA

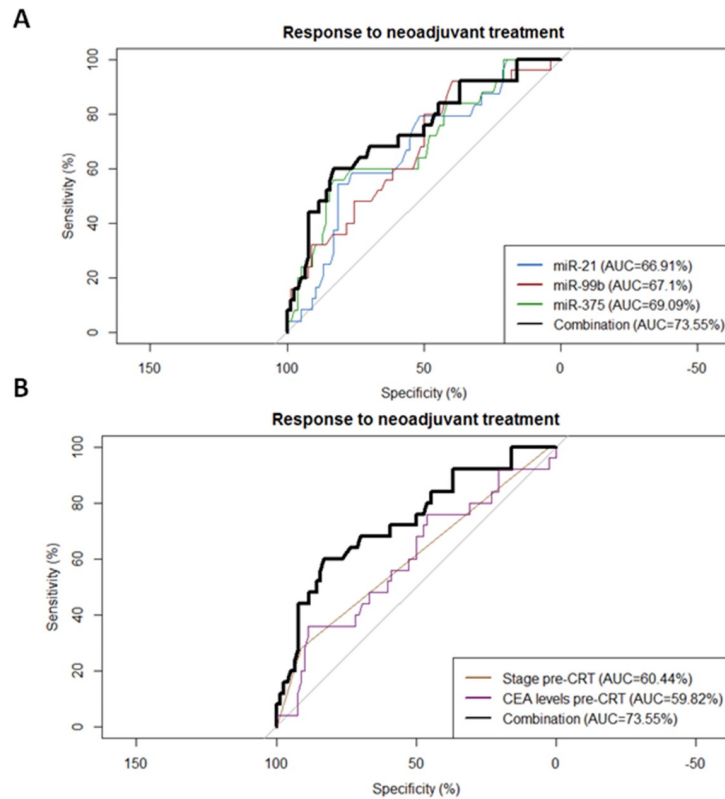


Fig 2. (A) ROC curve analyses to evaluate the potential utility of miR-21, miR-99b, miR-375 and their combination to distinguish patients with maximum response to neoadjuvant treatment (TRG4) from others. (B) ROC curve analysis comparing the miRNA combination with pre-CRT clinical stage and CEA levels.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206542.g002>

combination with other clinical factors, pre-CRT clinical stage and pre-CRT CEA levels were included in the analysis. The miRNA combination was a more reliable predictive biomarker than the clinical factors (Fig 2B).

Finally, we performed a multivariate analysis of response to neoadjuvant treatment including sex, age, stage pre-CRT, CEA levels pre-CRT and the miRNA combination. Only the miRNA combination emerged as an independent marker of neoadjuvant treatment response (odds ratio [OR]: 0.439; 95% CI: 0.242–0.797; $p = 0.007$).

Validation phase II: Prognosis impact of the tumor response-related miRNAs

Overall median DFS and median OS were not reached. Overall, mean DFS was 79.8 months (95% CI: 71.5–88.1), and mean OS was 89.7 months (95% CI: 82.9–96.5).

There were no statistical significant differences in DFS or OS regarding sex, age, clinical stage, or administration of adjuvant chemotherapy treatment or the TRG (Table 1). On the other hand, there were significant differences on DFS and OS related to pathological stage (DFS: $p = 0.047$; OS: $p = 0.044$) or downstaging with CRT treatment (DFS: $p = 0.002$; OS: $p = 0.001$).

Expression levels of the eight identified miRNAs were correlated with DFS and significant associations were observed for let-7e and miR-328. Mean DFS for patients with low let-7e levels was 68.11 months (95% CI: 55.9–80.3), while it was 83.8 months (95% CI: 75.7–91.9) for those with high levels ($P = 0.003$, Fig 3A). Mean DFS for patients with high miR-328 levels

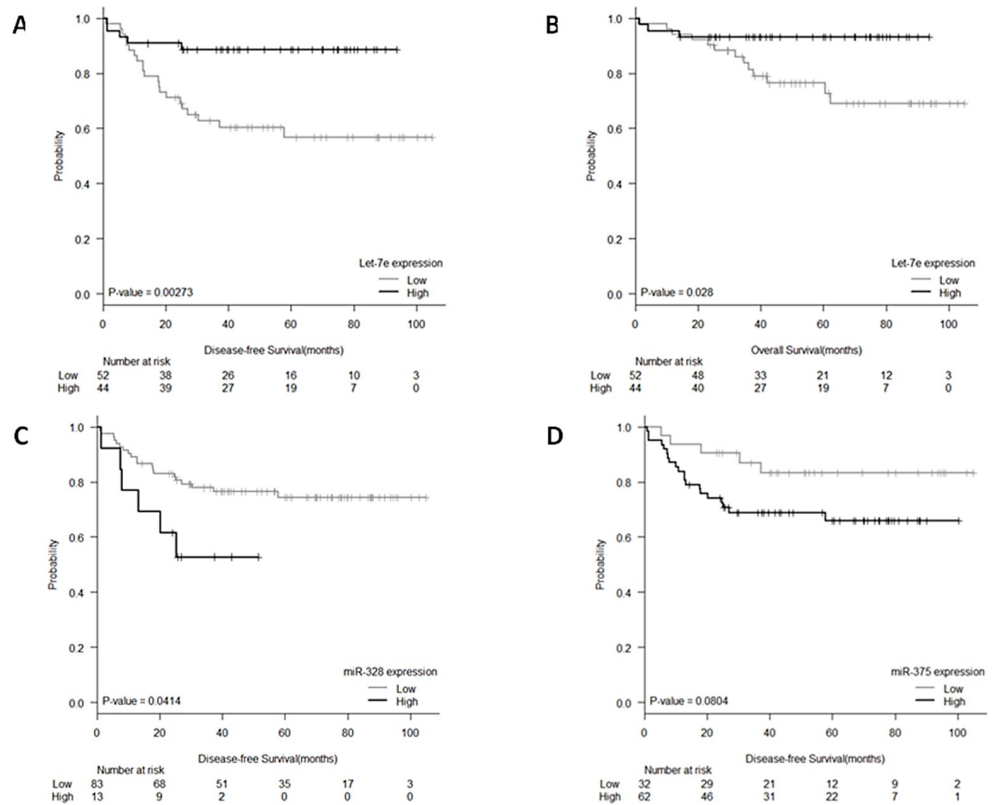


Fig 3. Kaplan–Meier curves for (A) DFS according to let-7e expression, (B) OS according to let-7e expression, (C) DFS according to miR-328 expression, and (D) DFS according to miR-375 expression.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206542.g003>

was 33.2 months (95% CI: 22.2–44.1), while it was 82.9 months (95% CI: 74.4–91.3) for those with low levels ($P = 0.041$, Fig 3C). A trend to significance was also observed for miR-375 where mean DFS for patients with high levels was 71.7 months (95% CI: 61.3–82), while it was 90.8 months (95% CI: 79.5–102.3) for those with low levels ($P = 0.080$, Fig 3D). Moreover, we also tested the prognostic impact of the miRNA combination (miR-21, miR-99b and miR-375) and we observed a trend for DFS, where mean DFS for patients with low levels was 74.5 months (95% CI: 64.03–84.9), while it was 78.8 months (95% CI: 68.5–89.1) for those with high levels ($P = 0.068$; Fig 4)

Only let-7e was significantly associated with OS. Mean OS for patients with low let-7e levels was 83.1 months (95% CI: 72.9–93.3), while it was 87.7 months (95% CI: 81.2–94.2) for those with high levels ($P = 0.028$, Fig 3B).

In the multivariate analyses for DFS (including all factors with univariate p -value ≤ 0.1 : ypN, ypT, pathological stage, downstaging, miR-328 and let-7e), ypT0 (OR, 0.278; $p = 0.021$), high miR-328 expression (OR, 4.340; $p = 0.004$) and low let-7e (OR, 6.196; $p = 0.001$) emerged as independent prognostic markers for DFS, while downstaging (OR, 0.182; $P < 0.003$), high miR-328 (OR, 3.905; $P = 0.047$) and low let-7e expression (OR, 3.678; $P = 0.044$) were independent markers for OS (Table 2).

Discussion

Preoperative CRT is a standard treatment for patients with locally advanced rectal cancer and its use is widespread in general clinical practice. However, about 20–40% of the patients do not

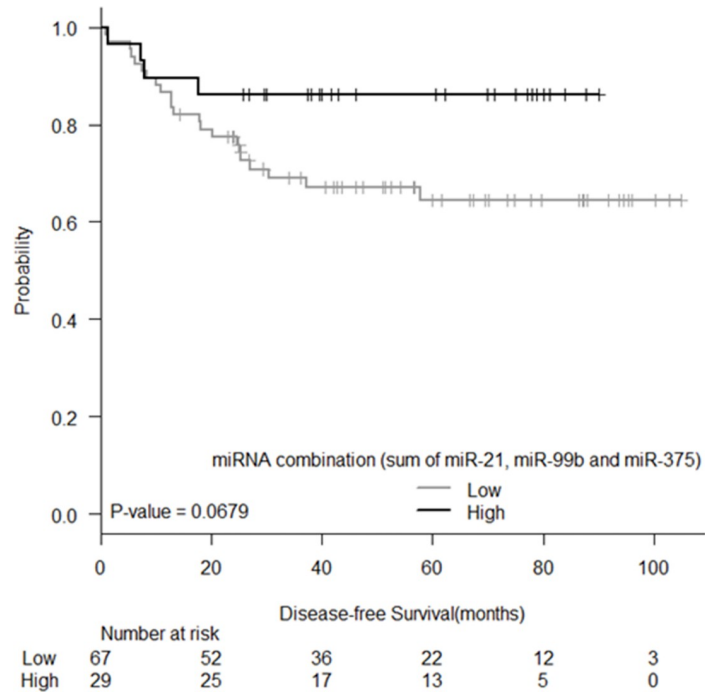


Fig 4. Kaplan-Meier curve for DFS according to the miRNA combination (sum of expression of miR-21, miR-99b and miR-375).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206542.g004>

respond to this neoadjuvant treatment[2]. Patients with a locally advanced rectal cancer are commonly explored with a rectal endoscopy, providing sufficient tissue for diagnosis and for molecular analyses before the start of the treatment. Despite sample availability for molecular analysis, currently there are no clinically validated biomarkers to correctly identify those patients that will not respond. Recent studies have shown an association between pretreatment serum carcinoembryonic antigen (CEA) levels with pCR and survival[26, 27]. Despite this, patient selection is still based on clinical stage and many patients are treated with potential toxic treatments and the definitive surgical resection is delayed [28].

Table 2. Multivariate analysis for DFS and OS.

Disease-Free Survival	Odds Ratio (95% CI)	P-value
ypN0	1.668 (0.458–6.069)	0.438
ypT0	0.278 (0.094–0.826)	0.021
Pathological stage I	0.655 (0.062–6.951)	0.725
Downstaging	0.556 (0.209–1.480)	0.240
High miR-328	4.340 (1.595–11.811)	0.004
Low let-7e	6.196 (2.166–17.722)	0.001
Overall Survival	Odds Ratio (95% CI)	P-value
ypN0	1.104 (0.233–5.236)	0.900
ypT0	0.606 (0.090–4.072)	0.607
Pathological stage I	0.611 (0.025–14.877)	0.762
Downstaging	0.182 (0.058–0.571)	0.003
High miR-328	3.905 (1.017–14.998)	0.047
Low let-7e	3.678 (1.038–13.038)	0.044

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206542.t002>

In our present work, we primarily found an eight-miRNA signature that characterize extreme responders (TRG4) using a screening group of patients with well characterized responses (6 TRG0-1 patients vs 6 TRG4 patients). The validation of the eight-miRNA signature in the whole cohort of 96 patients confirmed miR-21, miR-99b, miR-375 and let-7b as preoperative CRT response-related miRNAs. miR-21, miR-99b and miR-375 were significantly downregulated in TRG4 patients vs TRG0-3, while let-7b levels slowly decrease as TRG group increase, with its lower levels in the TRG4 group of patients. Since we were interested in identifying extreme responder patients, we focused in miR-21, miR-99b and miR-375. The ROC curve analysis indicated that these 3 miRNAs were able to predict preoperative CRT response. Interestingly, the combination of them, expressed as the sum of their values, had the best AUC value with a 60% sensitivity and 82.9% specificity to distinguish patients with maximum response from others.

In line with our results, miR-21 overexpression was correlated with non-complete response in a study with 76 rectal adenocarcinomas biopsies before preoperative CRT(RT+5-FU)[29]. However, other studies reported the contrary, that miR-21 overexpression correlated with complete tumor regression[30] [31]. In Eriksen *et al.* study[31], the one with a great cohort, miR-21 was downregulated in responder patients in the test cohort ($n = 55$, $p = 0.062$) while was upregulated in responders in the validation cohort ($n = 130$, $p = 0.035$). This indicates that the role of miR-21 in preoperative CRT response need to be further studied. In line with our results, *in vitro* studies showed that miR-21 have been found to be overexpressed in 5-FU-resistant colorectal cancer cell lines[32].

miR-99b have been reported upregulated after 5-FU treatment and have predicted targets involved in regulation of autophagy in HT-29 cells[33]. Autophagy has been increasingly recognized as a prosurvival cellular response activated in times of stress during chemotherapy[34] and can promote chemotherapy resistance. miR-99b targets include mTOR signaling pathway which inhibition has been previously related in breast cancer cells with an increase in autophagy[35].

miR-375 overexpression have been previously related to resistance to ionizing radiation and etoposide treatment in gastric cancer cell lines through p53 regulation[36] and elevated miR-375 has been linked to recurrent gastric cancer[37]. In addition, in cervical cancer cell lines overexpression of miR-375 have been related to paclitaxel resistance[38]. In colon cancer, miR-375 have been related to cetuximab resistance through regulation of the AKT pathway by targeting the tumor suppressor gene PHLPP1[39]. Recently, Conde-Muiño *et al.* described that miR-375 through regulation of cMyc played a role in chemoresistance to neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer[40]. All these results are in line with our observation that non-responder patients present high levels of miR-375.

Previous works with lower number of patients have described other miRNAs correlated with response to CRT treatment in rectal cancer that we have not identified in our study: overexpression of miR-31 have been correlated with poor response and worse OS[41]; miR-622 and miR-630 had a 100% sensitivity and specificity in selecting patients with maximum response in a study with 38 patients treated with Capecitabine and Oxaliplatin and radiotherapy[15].

In addition, we studied the potential role of the 8 miRNAs found in the screening phase with the clinical outcome of the patients. In this setting, we found significant differences on DFS regarding expression of let-7e and miR-328 and significant differences on OS depending of expression of let-7e. Moreover, patients with low levels of miR-375 (that correlated with better response) had a trend to better DFS. Interestingly, let-7e and miR-328 emerged as independent prognostic factors for DFS and OS in the multivariate analyses. Patients with high levels of miR-328 and those patients with low levels of let-7e had shorter DFS and OS.

High expression levels of let-7e have been previously correlated with better response to CRT[18]. This result is in line with the results obtained in our screening phase, where we observed that responder patients (TRG4) had higher let-7e levels. Despite we could not validate this result in the whole cohort for treatment response; let-7e emerged as an independent biomarker for DFS and OS. The members of let-7 family have been previously associated with patient outcome in multiple tumors including colorectal cancer[42].

In summary, in the present work we have identified a miRNA signature involved in preoperative CRT response and outcome of rectal cancer patients. Although the present study included a relatively large series with a homogeneous population and treatment; the presented results have to be taken with caution since it is a retrospective study and need to be confirmed in a prospective study. However, miRNAs identified in the present study could be a valuable additional tool for individualizing treatment in locally advanced rectal cancer patients.

Supporting information

S1 Table. Complete analysis results for the eight miRNAs identified in the screening phase according to TRG0-3 vs TRG4 groups. Mean, median, IQR, and non-normalized Ct values. Mean and range are summarized for each group.

(DOCX)

S1 Data. Table with the 8 miRNA CT and normalization controls for the full cohort.

(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: Marc Campayo, Alfons Navarro.

Data curation: Alfons Navarro, Jose Carlos Benítez.

Formal analysis: Alfons Navarro, Sandra Santasusagna.

Investigation: Marc Campayo.

Methodology: Marc Campayo, Alfons Navarro.

Project administration: Marc Campayo.

Resources: Marc Campayo, Carme Ferrer.

Software: Jose Carlos Benítez.

Supervision: Marc Campayo.

Validation: Marc Campayo.

Visualization: Jose Carlos Benítez.

Writing – original draft: Marc Campayo.

Writing – review & editing: Marc Campayo, Alfons Navarro, Mariano Monzó, Luis Cirera.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018; 68(1):7–30.
2. R o C, Martus P, Papadopoulos T, zesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23(34):8688–96. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.1329> PMID: 16246976



3. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004; 351(17):1731–40. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040694> PMID: 15496622
4. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2012; 30(16):1926–33. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.1836> PMID: 22529255
5. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004; 116(2):281–97. PMID: 14744438
6. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell cycle*. 2008; 7(17):2643–6. <https://doi.org/10.4161/cc.7.17.6597> PMID: 18719391
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*. 2009; 136(2):215–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002> PMID: 19167326
8. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Søkilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, et al. The rectal cancer microRNAome—microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clinical cancer research*. 2012; 18(18):4919–30. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0016> PMID: 22850566
9. Franco R, Pirozzi G, Scala S, Cantile M, Scognamiglio G, Camerlingo R, et al. CXCL12-binding receptors expression in non-small cell lung cancer relates to tumoral microvascular density and CXCR4 positive circulating tumoral cells in lung draining venous blood. *European journal of cardio-thoracic surgery*. 2012; 41(2):368–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2011.05.009> PMID: 21683606
10. Port M, Glaesener S, Ruf C, Riecke A, Bokemeyer C, Meineke V, et al. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines. *Molecular cancer*. 2011; 10(1):52.
11. Fu X, Tian J, Zhang L, Chen Y, Hao Q. Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS letters*. 2012; 586(9):1279–86. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.006> PMID: 22465665
12. Sugimura K, Miyata H, Tanaka K, Hamano R, Takahashi T, Kurokawa Y, et al. Let-7 expression is a significant determinant of response to chemotherapy through the regulation of IL-6/STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research*. 2012; 18(18):5144–53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0701> PMID: 22847808
13. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozenci LA, Vasile E, et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer research*. 2010; 70(11):4528–38. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4467> PMID: 20460539
14. Hong L, Han Y, Yang J, Zhang H, Zhao Q, Wu K, et al. MicroRNAs in gastrointestinal cancer: prognostic significance and potential role in chemoresistance. *Expert opinion on biological therapy*. 2014; 14(8):1103–11. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.907787> PMID: 24707835
15. Scarpati GDV, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, et al. A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics*. 2012; 83(4):1113–9.
16. Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, VALLböHMER D, Bollschweiler E, Brabender J, et al. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *International journal of oncology*. 2011; 39(2):409–15. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1036> PMID: 21567082
17. Hotchi M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Morimoto S, et al. microRNA expression is able to predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Molecular and clinical oncology*. 2013; 1(1):137–42. <https://doi.org/10.3892/mco.2012.9> PMID: 24649136
18. Svoboda M, Sana J, Fabian P, Kocakova I, Gombosova J, Nekvindova J, et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiation oncology*. 2012; 7(1):195.
19. Kheirleisid EA, Miller N, Chang KH, Curran C, Hennessey E, Sheehan M, et al. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy. *International journal of colorectal disease*. 2013; 28(2):247–60. <https://doi.org/10.1007/s00384-012-1549-9> PMID: 22903298
20. Salendo J, Spitzner M, Kramer F, Zhang X, Jo P, Wolff HA, et al. Identification of a microRNA expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells, involving miRNAs-320a,-224,-132 and let7g. *Radiotherapy and oncology*. 2013; 108(3):451–7. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.032> PMID: 23932154

21. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *International journal of colorectal disease*. 1997; 12(1):19–23. PMID: [9112145](#)
22. Monzo M, Santasusagna S, Moreno I, Martinez F, Hernández R, Muñoz C, et al. Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(19):30859. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16103> PMID: [28415718](#)
23. Navarro A, Diaz T, Gallardo E, Viñolas N, Marrades RM, Gel B, et al. Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer. *Journal of surgical oncology*. 2011; 103(5):411–5. <https://doi.org/10.1002/jso.21847> PMID: [21400525](#)
24. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC bioinformatics*. 2011; 12(1):77.
25. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computational Statistics & Data Analysis*. 2003; 43(2):121–37.
26. Dayde D, Tanaka I, Jain R, Tai MC, Taguchi A. Predictive and prognostic molecular biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18(3):573.
27. Zeng W-G, Liang J-W, Wang Z, Zhang X-M, Hu J-J, Hou H-R, et al. Clinical parameters predicting pathologic complete response following neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Chinese journal of cancer*. 2015; 34(3):41.
28. Lefevre JH, Mineur L, Kotti S, Rullier E, Rouanet P, de Chaisemartin C, et al. Effect of interval (7 or 11 weeks) between neoadjuvant radiochemotherapy and surgery on complete pathologic response in rectal cancer: a multicenter, randomized, controlled trial (GRECCAR-6). *Journal of Clinical Oncology*. 2016; 34(31):3773–80. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.6049> PMID: [27432930](#)
29. Caramés C, Cristóbal I, Moreno V, Del Puerto L, Moreno I, Rodríguez M, et al. MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *International journal of colorectal disease*. 2015; 30(7):899–906. <https://doi.org/10.1007/s00384-015-2231-9> PMID: [25953218](#)
30. Lopes-Ramos CM, Habr-Gama A, de Souza Quevedo B, Felício NM, Bettoni F, Koyama FC, et al. Overexpression of miR-21-5p as a predictive marker for complete tumor regression to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *BMC medical genomics*. 2014; 7(1):68.
31. Eriksen AHM, Sørensen FB, Andersen RF, Jakobsen A, Hansen TF. Association between the expression of microRNAs and the response of patients with locally advanced rectal cancer to preoperative chemoradiotherapy. *Oncology letters*. 2017; 14(1):201–9. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6141> PMID: [28693154](#)
32. Kurokawa K, Tanahashi T, Ima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, et al. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *Journal of gastroenterology*. 2012; 47(8):883–95. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0547-6> PMID: [22382630](#)
33. Hou N, Han J, Li J, Liu Y, Qin Y, Ni L, et al. MicroRNA profiling in human colon cancer cells during 5-fluorouracil-induced autophagy. *PloS one*. 2014; 9(12):e114779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114779> PMID: [25526515](#)
34. Yu X, Li Z, Yu J, Chan MT, Wu WK. MicroRNAs predict and modulate responses to chemotherapy in colorectal cancer. *Cell proliferation*. 2015; 48(5):503–10. <https://doi.org/10.1111/cpr.12202> PMID: [26202377](#)
35. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *cell*. 2008; 132(1):27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018> PMID: [18191218](#)
36. Liu Y, Xing R, Zhang X, Dong W, Zhang J, Yan Z, et al. miR-375 targets the p53 gene to regulate cellular response to ionizing radiation and etoposide in gastric cancer cells. *DNA repair*. 2013; 12(9):741–50. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.06.002> PMID: [23835407](#)
37. Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Annals of oncology*. 2011; 22(10):2257–66. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq758> PMID: [21343377](#)
38. Shen Y, Wang P, Li Y, Ye F, Wang F, Wan X, et al. miR-375 is upregulated in acquired paclitaxel resistance in cervical cancer. *British journal of cancer*. 2013; 109(1):92. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.308> PMID: [23778521](#)
39. Mussnich P, Rosa R, Bianco R, Fusco A, D'Angelo D. MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2015; 19(8):1017–26. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1057569> PMID: [26107137](#)
40. Conde-Muñoz R, Cano C, Sánchez-Martín V, Herrera A, Comino A, Medina PP, et al. Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer: the sensitizer role of the association between miR-375 and c-Myc. *Oncotarget*. 2017; 8(47):82294. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19393> PMID: [29137264](#)

41. Caramés C, Cristobal I, Moreno V, Marín JP, González-Alonso P, Torrejón B, et al. MicroRNA-31 Emerges as a Predictive Biomarker of Pathological Response and Outcome in Locally Advanced Rectal Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2016; 17(6):878.
42. Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Current oncology*. 2010; 17(1):70. PMID: [20179807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20179807/)

Article

Lincp21-RNA as Predictive Response Marker for Preoperative Chemoradiotherapy in Rectal Cancer

Jose Carlos Benitez ^{1,2,†}, Marc Campayo ^{2,*,†}, Tania Díaz ³, Carme Ferrer ⁴, Melissa Acosta-Plasencia ³, Mariano Monzo ³, Luis Cirera ², Benjamin Besse ^{1,5} and Alfons Navarro ^{3,*}

- ¹ Department of Cancer Medicine, Gustave Roussy Cancer Center, 94805 Villejuif, France; josecarlos.benitez-montanez@gustaveroussy.fr (J.C.B.); benjamin.besse@gustaveroussy.fr (B.B.)
- ² Department of Medical Oncology, Mutua Terrassa University Hospital, University of Barcelona, 08221 Terrassa, Spain; lcirera@mutuaterrassa.es
- ³ Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain; tdiaz@ub.edu (T.D.); melissaacostaplasencia@gmail.com (M.A.-P.); mmonzo@ub.edu (M.M.)
- ⁴ Department of Pathology, Mutua Terrassa University Hospital, University of Barcelona, 08221 Terrassa, Barcelona, Spain; carmeferrer@mutuaterrassa.es
- ⁵ Faculty of Science, Orsay Campus, Paris-Saclay University, 91400 Orsay, France
- * Correspondence: mcampayo@mutuaterrassa.es (M.C.); anavarroponz@ub.edu (A.N.)
- † These two authors contributed equally to this work.

Abstract: Preoperative chemoradiotherapy (CRT) is a standard treatment for locally advanced rectal cancer (RC) patients, but its use in non-responders can be associated with increased toxicities and resection delay. LincRNA-p21 is a long non-coding RNA involved in the p53 pathway and angiogenesis regulation. We aimed to study whether lincRNA-p21 expression levels can act as a predictive biomarker for neoadjuvant CRT response. We analyzed RNAs from pretreatment biopsies from 70 RC patients treated with preoperative CRT. Pathological response was classified according to the tumor regression grade (TRG) Dworak classification. LincRNA-p21 expression was determined by RTqPCR. The results showed that lincRNA-p21 was upregulated in stage III tumors ($p = 0.007$) and in tumors with the worst response regarding TRG ($p = 0.027$) and downstaging ($p = 0.016$). ROC curve analysis showed that lincRNA-p21 expression had the capacity to distinguish a complete response from others (AUC:0.696; $p = 0.014$). LincRNA-p21 was shown as an independent marker of preoperative CRT response ($p = 0.047$) and for time to relapse (TTR) ($p = 0.048$). In conclusion, lincRNA-p21 is a marker of advanced disease, worse response to neoadjuvant CRT, and shorter TTR in locally advanced RC patients. The study of lincRNA-p21 may be of value in the individualization of pre-operative CRT in RC.

Keywords: lincRNA-p21; rectal cancer; chemoradiotherapy; colorectal cancer; long non-coding RNA; p53; predictive biomarker



Citation: Benitez, J.C.; Campayo, M.; Diaz, T.; Ferrer, C.; Acosta-Plasencia, M.; Monzo, M.; Cirera, L.; Besse, B.; Navarro, A. Lincp21-RNA as Predictive Response Marker for Preoperative Chemoradiotherapy in Rectal Cancer. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 420. <https://doi.org/10.3390/jpm11050420>

Academic Editor: James Meehan

Received: 22 April 2021

Accepted: 12 May 2021

Published: 16 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Rectal cancer (RC) accounts for approximately one-third of all colorectal tumors (CRC) and remains the third most common cancer worldwide and the second leading cause of cancer-related death in the world [1]. RC differs in etiologies and risk factors due to odd environmental exposures [2,3] and may have unique genetics and epigenetics factors [4]. However, during the past decade, reduction in mortality for RC has slowed [1] owing to a high rate of distant metastasis (29–39%) [5,6]. Long-term analysis has shown that preoperative chemoradiotherapy (CRT) followed by surgery of primary tumor results in persistent local control [5] and has become the standard of care for locally advanced tumors (T3-T4 or N+) [7]. The most frequently used chemotherapy agent is 5-fluorouracil in combination with concurrent fractionation radiotherapy [7]. Preoperative CRT achieves a higher radiosensitivity of tissues before surgery, a lower rate of toxicities, and a higher probability

of sphincter preservation due to tumor downstaging [8]. Of note, the rate of pathological response after neoadjuvant treatment has been associated with prognosis [8,9]. Pathological complete response (pCR; ypT0N0), which occurs in 15–25% of patients, has been linked with lower rates of local recurrences [9,10]. Indeed, to achieve a complete response after preoperative CRT has been associated with better disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) rates [9]. Nonetheless, survival outcomes of patients with an assessed pCR compared to those without have not been properly compared; therefore, selection of patients to avoid unnecessary toxicities and to perform suitable management remains uncertain. Furthermore, despite the adoption of adjuvant postoperative chemotherapy, patients are more than twice as likely to present with a distant recurrence rather than tumor regrowth at the primary site [5,6]. This situation emphasizes the urgency of devising upfront treatment strategies aimed at controlling obscure micro-metastases. Identifying patients who will not respond to treatment is crucial to avoid unnecessary treatment, potential toxicities, and a delay of surgery. Biomarkers to identify patients at high risk of relapse or lack of response are needed to guide treatment options and improve survival rates [11], and non-coding RNAs are promising candidates [12,13].

Non-coding RNAs comprise 97% of the transcriptome, while protein-coding messenger RNAs (mRNA) account for only 3% [14]. Long non-coding RNAs (lncRNAs) have been related to the main hallmarks of cancer [15] and have been described as key in the tumorigenesis of different solid tumors, including RC [16,17]. Indeed, lncRNAs have been shown to be highly tissue specific [18,19], being able to discriminate between tumor and normal cells [20]. The long intergenic non-coding RNA p21 (lincRNA-p21) acts as a regulator for p53-mediated apoptosis [21], angiogenesis [22], and HIF1A-mediated response to hypoxia in cancer cells [23]. However, the role of lincRNA-p21 in RC remains poorly understood and explored only in vitro or using small cohorts of patients [24,25]. In this setting, lncRNAs, and especially lincRNA-p21, could serve as predictive biomarkers to select the most optimal treatment in each case in order to individualize therapy. We aimed to evaluate whether lincRNA-p21 can act as a predictive biomarker for CRT response in a 70-patient cohort of RC treated before resection.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Seventy patients diagnosed from December 2006 to October 2016, with RC and available baseline endoscopy biopsy from Mutua Terrassa University Hospital, were included in the present study. All selected patients suffered with rectal adenocarcinoma in a clinical stage II or III (uT3-T4 and/or uN+) and were consecutively treated at Mutua Terrassa University Hospital. Although the study population was collected in Barcelona (Europe), ethnical information was not considered for patient inclusion within the study. All samples were stored as paraffin-embedded blocks until use. All patients had received neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil $225 \text{ mg/m}^2/\text{day} \times 7$ days in continuous infusion and in combination with pelvic locoregional radiotherapy (45–50 Gy). Six to eight weeks after completion, all patients underwent surgery. All surgical specimens were evaluated and classified according to TNM 7th edition, and the pathological response was graded according to the tumor regression grade (TRG) Dworak classification [26]. Approval for the study was obtained from the Institutional Review Board of the Mutua Terrassa University Hospital, Barcelona, Spain.

2.2. RNA Extraction and lincRNA-p21 Quantification

Total RNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded, tumor tissues from pretreatment endoscopy biopsies using a RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) as previously reported [27] and quantified using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Total cDNA was obtained from 250 ng of RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). LincRNA-

p21 expression was determined as previously described [22]. LincRNA-p21 expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ using B2M (beta-2-microglobulin) (Hs99999907_m1) (Applied Biosystems) as endogenous control.

2.3. Statistical Methods

Assumptions of distributional normality were tested using the Shapiro–Wilk test and quantile–quantile plot. Continuous data were tested with the T-test (two groups) or ANOVA (more than two groups) when normally distributed and the Mann–Whitney U-test or Kruskal–Wallis test when not normally distributed. ROC curves were calculated using R package pROC [28]. The multivariate analysis for treatment response was performed by using binary logistic regression. Time to relapse (TTR) was defined as the time between resection and recurrence or last follow-up. Overall survival (OS) was calculated from the time of resection to the date of death or last follow-up. Optimal cutoffs of lincRNA-p21 expression data for TTR and OS were obtained using X-Tile software [29]. Kaplan–Meier curves for TTR and OS were plotted and compared with log-rank test. The multivariate analysis was performed using the stepwise proportional hazard Cox regression model to determine hazard ratios (HR) with their 95% confidence intervals (CI). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 26 (SPSS Inc., IBM, Chicago, IL, USA), R 4.0.2 and GraphPad Prism v9.1.0.

3. Results

3.1. Patient Characteristics

Samples from 70 patients were analyzed, most of whom were males ($n = 49$, 70%). Median age at diagnosis was 66 (range: 38 to 82) years. Sixty-one (87.1%) patients reported stage III and 9 (12.9%) stage II; 52 (74.3%) patients were assessed for TRG 0–3, and 18 (25.7%) reported pathological complete response (TRG 4, ypT0N0); 64.3% of downstaging was shown. Finally, 43 (66.2%) patients received adjuvant chemotherapy after primary tumor resection. Table 1 shows further main characteristics of the 70 patients included in the study. Median follow-up time was 105.40 months (IQR: 78.63–127.33).

Table 1. Main clinical characteristics of the 70 patients included in the study with their associated time to relapse (TTR) and overall survival (OS) according to the univariate analyses (log rank). Significant p -values are shown in bold. RC: rectal cancer; CRT: Chemo-radiotherapy.

Characteristic		Number of Patients (%)	TTR <i>p</i> -Value	OS <i>p</i> -Value
Sex	Male	49 (70)	0.203	0.269
	Female	21 (30)		
Median age (range)	66 (38–82)			
	<60	19 (27.1)	0.679	0.815
	>60	51 (72.9)		
Clinical stage pre-CRT	II	9 (12.9)	0.585	0.497
	III	61 (87.1)		
Adjuvant therapy	No	27 (33.8)	0.776	0.130
	5-FLU	7 (8.7)		
	FOLFOX	40 (50)		
	Other	6 (7.5)		

Table 1. Cont.

Characteristic		Number of Patients (%)	TTR <i>p</i> -Value	OS <i>p</i> -Value
ypT	ypT0	18 (25.7)	0.015	0.051
	ypT1–2	18 (25.7)		
	ypT3–4	34 (48.6)		
ypN	ypN0	48 (68.6)	0.003	0.044
	ypN1–2	22 (31.4)		
Pathological stage after neoadjuvant CRT	ypT0N0	17 (24.2)	0.024	0.133
	I	16 (22.9)		
	II	14 (20)		
	III	23 (32.9)		
Downstaging	No	25 (35.7)	0.001	0.010
	Yes	45 (64.3)		
Tumor regression grade (TRG)	0–3	52 (74.3)	0.324	0.161
	4	18 (25.7)		

3.2. lincRNA-p21 Expression Levels

The correlation of lincRNA-p21 levels in tumor tissue with the main clinicopathological characteristics showed a significant association with disease stage, ypT, ypN, pathological stage (ypTNM), downstaging, and pathological response. lincRNA-p21 was up-regulated in stage III compared to stage II tumors ($p = 0.007$) (Figure 1A). Significant differences in lincRNA-p21 levels were observed according to ypT, where the ypT0 group had the lowest levels ($p = 0.0493$, Figure 1B). Patients with ypN1–2 showed higher levels of lincRNA-p21 ($p = 0.02$). Furthermore, patients with pathological stage III had higher lincRNA-p21 levels ($p = 0.0171$). Tumors with the worst response to CRT regarding negative downstaging and TRG 0–3 showed higher levels of lincRNA-p21 than tumors with positive downstaging ($p = 0.0165$; Figure 1E) and TRG4 (TRG0–3, $n = 52$ vs. TRG4, $n = 18$, $p = 0.027$; Figure 1F).

3.3. Predictive Ability of lincRNA-p21 for Response to CRT

Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to investigate the potential of lincRNA-p21 as a marker for neoadjuvant treatment response. The area under the curve (AUC) value showed that lincRNA-p21 expression had capacity to distinguish patients with complete response (TRG4) from others (AUC: 0.696; 95% confidence interval (CI) = 0.558–0.833; $p = 0.014$). In the optimum truncation point (−0.1), the sensitivity and specificity were 83.3% and 57.7%, respectively (Figure 2A). Using the best threshold identified by the ROC curve analysis, we divided the patients into two groups, observing that there were differences in TRG proportions allocation between low or high lincRNA-p21 levels ($p = 0.026$, Figure 2B). Among patients with low levels of lincRNA-p21, 39.5% had a TRG 4 vs. only 9.4% in the group with a high lincRNA-p21 expression value.

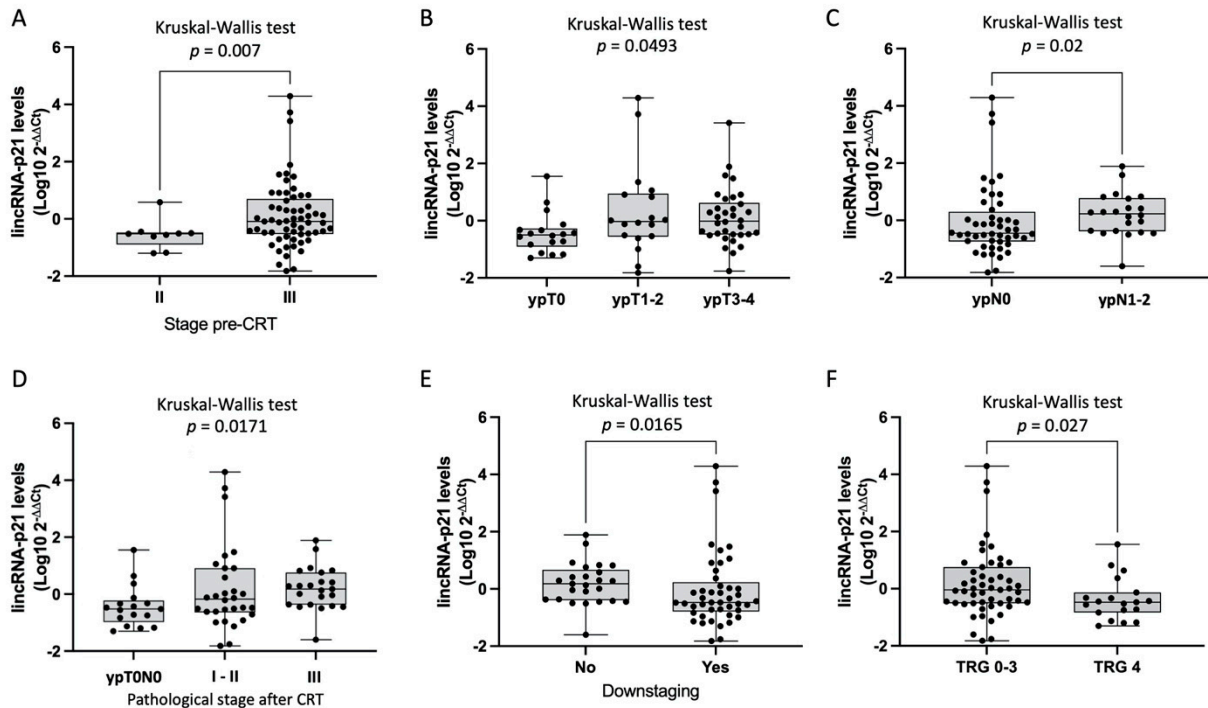


Figure 1. LincRNA-p21 levels and clinicopathological characteristics. (A) LincRNA-p21 expression in (A) stage III vs. stage II; (B) ypT0 vs. ypT1–2 vs. ypT3–4; (C) ypN0 vs. ypN1–2; (D) ypT0N0 vs. I–II vs. III; (E) downstaging no vs. yes; (F) TRG 0–3 vs. TRG 4.

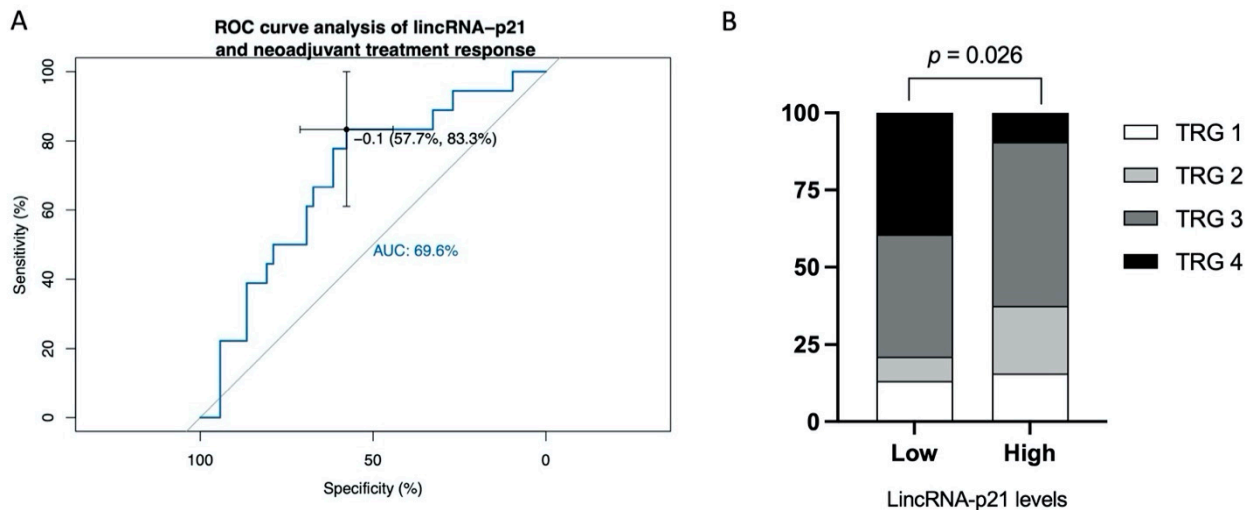


Figure 2. Predictive analyses for response to neoadjuvant treatment. (A) ROC curve analyses to evaluate the potential utility of lincRNA-p21 to distinguish patients with maximum response to neoadjuvant treatment (TRG4) from others (TRG 0–3). (B) Percentage of patients with each TRG according to low vs. high lincRNA-p21 expression, dichotomized using optimum truncation point obtained in the ROC curve analysis (−0.1). AUC, area under the curve. TRG, tumor regression grade.

Finally, we performed a multivariate analysis of response to neoadjuvant treatment including sex, age, pre-CRT stage, CEA levels pre-CRT, and lincRNA-p21 levels (Table 2). Only lincRNA-p21 levels emerged as an independent marker of neoadjuvant treatment response (odds ratio (OR): 0.485; 95% CI: 0.237–0.992; $p = 0.047$).

Table 2. Results obtained in the multivariate logistic analysis for complete response to neoadjuvant treatment (TRG4 vs. others).

Factors	OR (95% CI)	p-Value
Stage II at diagnosis	1.703 (0.363–8.003)	0.500
Age	0.980(0.918–1.046)	0.549
Gender male	2.756 (0.682–11.137)	0.155
CEA at baseline	0.930 (0.809–1.068)	0.301
LincRNA-p21 levels	0.485 (0.237–0.992)	0.047
Constant	0.307	<0.001

3.4. LincRNA-p21 Expression and Survival

In our cohort, overall, median TTR and median OS were not reached (NR). Overall, mean TTR was 136.5 months (95% CI: 127.8–145.2) and mean OS was 124.3 months (95% CI: 114–134.6).

Using the optimal cutoff values identified by X-Tile, the patients were classified in two groups as having high or low lincRNA-p21 levels. Among the 70 RC patients, 26 were classified as low, and 44 as high. Patients with high lincRNA-p21 levels had significantly shorter TTR ($p = 0.014$). TTR for patients with high levels was 104.4 months (95% CI 86.4–122.5), while it was 126.2 months (95% CI 115.7–136.6) for those with low levels (Figure 3A). No significant differences were observed for OS ($p = 0.284$), but patients with high lincRNA-p21 levels had shorter OS (116.9 vs. 129.5 months; Figure 3B).

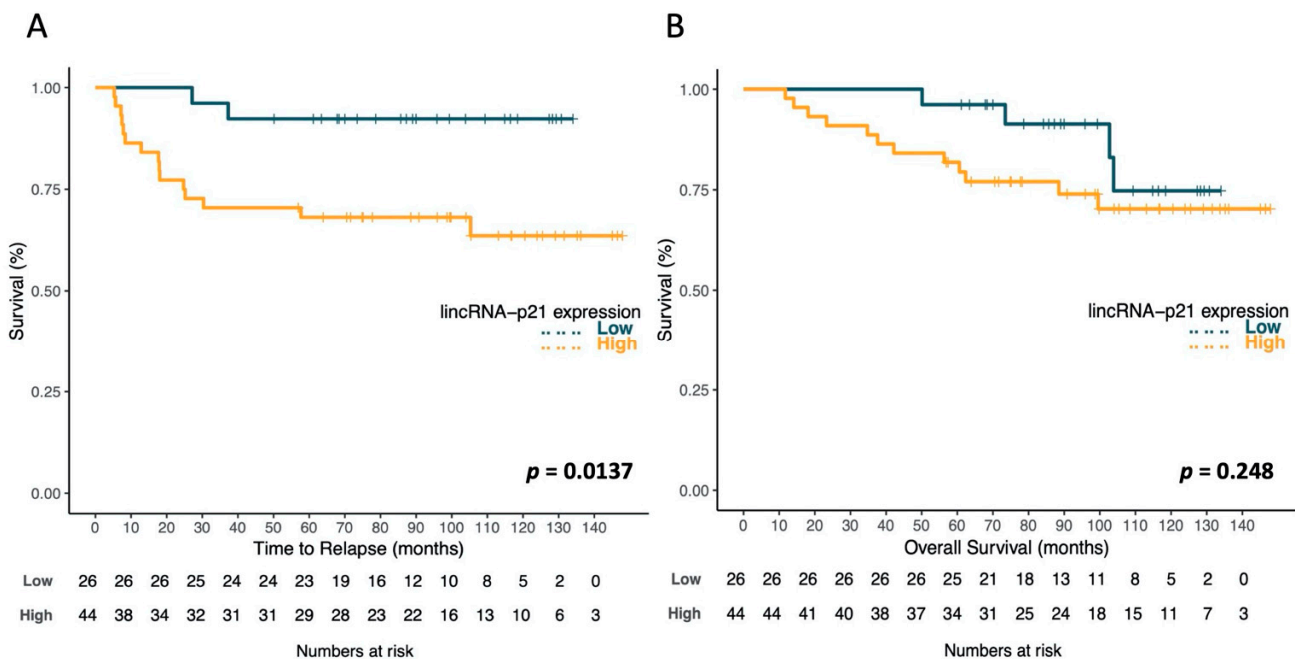


Figure 3. Kaplan–Meier curves for time to relapse (TTR) (A) and overall survival (OS) (B) according to lincRNA-p21 expression levels in 70 rectal cancer patients. The log-rank test was used to calculate whether significant differences in survival times between high or low lincRNA-p21 levels were achieved.

3.5. Multivariate Analysis of TTR and OS

In the univariate analysis, there were statistically significant differences in TTR and OS related to tumor pathological stage (ypT), lymph node pathological stage after CRT (ypN), pathological stage after CRT (ypTNM), and downstaging. The p-values are summarized in Table 1. Since ypT and ypN are included in the calculation of pathological stage, ypTNM, we decided to include only the pathological stage, downstaging, and the lincRNA-p21 expression in the Cox multivariate analysis (Table 3). The multivariate analysis showed that

lincRNA-p21 levels (HR, 4.458; 95% CI, 1.014–19.603; $p = 0.048$) and stage (HR, 4.430; 95% CI: 1.266–15.497; $p = 0.020$) were independent prognostic factors for TTR, while downstaging (HR, 3.512; 95% CI: 1.275–9.673; $p = 0.015$) was the unique independent prognostic factor for OS.

Table 3. Multivariate analysis for TTR and OS.

Time to Relapse	HR (95% CI)	<i>p</i> -Value
Pathological stage > I	4.430 (1.266–15.497)	0.020
No downstaging	1.737 (0.350–8.621)	0.499
High lincRNA-p21	4.458 (1.014–19.603)	0.048
Overall Survival	HR (95% CI)	<i>p</i> -Value
Pathological stage > I	2.020 (0.362–11.273)	0.423
No downstaging	3.512 (1.275–9.673)	0.015
High lincRNA-p21	1.387 (0.411–4.679)	0.598

4. Discussion

We showed the potential use of lincRNA-p21 expression levels in tumor tissue from baseline biopsies of RC patients as a predictive marker of CRT response and as a prognostic biomarker for TTR. Firstly, we observed that higher lincRNA-p21 levels were found in patients with stage III pre-CRT, and, interestingly, after CRT treatment, the highest lincRNA-p21 levels were reported for patients presenting pathological stage III, and the lowest levels were found in patients with ypT0N0. Indeed, higher lincRNA-p21 levels were observed in patients with ypT3–4 and in ypN1–2 patients. These results are in line with previous reports in CRC [17,25]. In a cohort of 66 patients with CRC, including 39% (26/66) of RC [25], higher lincRNA-p21 levels were associated with poor prognostic factors, such as a poorer stage (stage III vs. I), tumor size (pT), and vascular invasion [25]. In another study, Li et al. analyzed 177 CRC tumors samples from surgical resection, of which 81 (45.7%) were RC; lincRNA-p21 was found as a marker of advanced disease, as higher lincRNA-p21 levels were observed in stage III patients and in N+ patients, and worse survival [17]. However, although these reports are in line with our results, we must take into account that we studied a different RC population, namely, patients receiving neoadjuvant treatment before surgery. Of note, this group of patients was excluded from both previous reports.

Secondly, we observed that lower lincRNA-p21 levels were found in patients who underwent tumor downstaging and complete pathological response after CRT treatment. Locally advanced rectal cancer patients are commonly explored with a rectal endoscopy, which provides sufficient tissue samples for diagnosis and biomarker analyses. Currently, there are no clinically validated biomarkers to correctly identify those patients that will not respond. LincRNA-p21 emerged as a predictive biomarker for CRT response, and when it was compared to other predictive factors at diagnosis such as baseline stage or CEA levels, it was shown as an independent predictor factor. The neoadjuvant CRT treatment in our cohort was based on 5-fluorouracil combined with locoregional radiotherapy. Wang et al. carried out an in vitro study aiming to evaluate the role of lincRNA-p21 in radiotherapy response [24]; in contrast to our results, they described that lincRNA-p21 expression level may affect the sensitivity to radiotherapy. In this study, the authors observed that after X-ray treatment, the levels of lincRNA-p21 became upregulated in two colorectal cancer cell lines, SW1116 and LOVO. When researchers overexpressed lincRNA-p21 in the SW1116 cell line and treated the cells with X-rays, they noted a higher apoptosis rate than in control cells; nonetheless, this result was not validated by the authors when they silenced lincRNA-p21 before X-ray treatment on the same cell line (no differences in apoptosis rate were observed between the silenced and control group). Our group has reported results in this line; however, we used a different cohort of patients (resected CRC patients not receiving neoadjuvant treatment) [17]. We observed that patients with tumors with high expression of lincRNA-p21 demonstrated an increased benefit of CRT as an adjuvant therapy (longer OS compared to those patients not receiving CRT after surgical resection [17]). Nonetheless,

these results are not comparable with the present work since our correlation was obtained in tumor tissue isolated prior to adjuvant CRT treatment administration. Moreover, the two previous references focused on the potential role of lincRNA-p21 and radiotherapy response in relation to its role in the p53 pathway [21,30–32]; nonetheless, we cannot ignore that rectal cancer patients included in the cohort also received 5-fluorouracil. Lee and colleagues analyzed the pattern of lincRNAs in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cell lines and observed that lincRNA-p21 was significantly upregulated in SNU-C5 5-FU-resistant cells compared to its parental cell line [33]. This provides an important insight into the involvement of lincRNA-p21 within 5-FU resistance of colon cancer cells and allows us to speculate the following: the better response rates observed in patients with low levels of lincRNA-p21 could be associated with, at least partially, an enhanced sensitivity to 5-fluorouracil. The role of lincRNA-p21 in 5-fluorouracil resistance and its effect when 5-FU is combined with radiotherapy deserves further study, but this is out of the scope of the present paper.

Finally, we found a correlation between high expression of lincRNA-p21 levels and shorter TTR. In this regard, high lincRNA-p21 levels have been previously related to a worst outcome in CRC [17] and also in other solid tumors such as non-small-cell lung cancer [22], bladder carcinoma [34], or hepatocellular carcinoma [35]. In CRC, Li et al. observed that lincRNA-p21 was found as a marker of advanced disease and worse survival outcomes, especially for RC where high lincRNA-p21 levels were linked to shorter DFS and shorter OS [17].

We are conscious that the present study has several limitations, including the small number of samples analyzed ($n = 70$), which can affect the robustness of the multivariate analysis. The results obtained in the multivariate analysis, despite being informative, need to be validated in a larger cohort. Moreover, an additional limitation is that lincRNA-p21 was analyzed in a retrospective cohort of paraffin-embedded samples. Nonetheless, no related studies have been published for RC patient cohorts in neoadjuvant settings, and our study may provide new evidence of epigenetic pathways behind the tumor response to CRT. LincRNA-p21 may be a promising predictive biomarker of CRT benefit, avoiding delay of resection and unnecessary comorbidities for those patients with tumors and reporting high expression levels of lincRNA-p21 at baseline.

5. Conclusions

LincRNA-p21 is a marker of advanced disease, worse response to neoadjuvant CRT, and shorter TTR in locally advanced rectal cancer patients. The study of lincRNA-p21 in endoscopy samples obtained prior to treatment decision may be of value in the individualization of pre-operative CRT in rectal cancer.

Author Contributions: Conceptualization, J.C.B., M.C. and A.N.; data curation, J.C.B., T.D., C.F. and A.N.; formal analysis, T.D. and A.N.; funding acquisition, M.C. and A.N.; investigation, T.D., M.A.-P. and A.N.; methodology, J.C.B., M.C. and A.N.; project administration, J.C.B., M.C. and A.N.; resources, J.C.B., M.M. and A.N.; supervision, J.C.B., M.C. and A.N.; validation, M.C. and A.N.; writing—original draft, J.C.B.; writing—review and editing, J.C.B., M.C., M.M., L.C., B.B. and A.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Ministry of Economy, Industry, and Competition, Agencia Estatal de Investigación co-financed with the European Union FEDER funds SAF2017-88606-P (AEI/FEDER, UE). None of the funding bodies had a role in the design of the study; in the collection, analysis, and interpretation of data; or in writing the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital of Terrassa.

Informed Consent Statement: Considering the retrospective nature of this research protocol with no impact on patients' treatment and the use of anonymized data only, written consent was not required. However, the CEIC from Hospital Mutua de Terrasa approved the study. Moreover, before the study started, all cases were de-identified and coded by an oncologist staff member (first author), and all data were accessed anonymously.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: All of the authors have reviewed and approved this version of the manuscript and agree with the decision to submit. None of the authors declare any conflicts of interest.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wei, E.K.; Giovannucci, E.; Wu, K.; Rosner, B.; Fuchs, C.S.; Willett, W.C.; Colditz, G.A. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int. J. Cancer* **2003**, *108*, 433–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kirkegaard, H.; Johnsen, N.F.; Christensen, J.; Frederiksen, K.; Overvad, K.; Tjønneland, A. Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: A prospective Danish cohort study. *BMJ* **2010**, *341*, c5504. [[CrossRef](#)]
4. Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; De Reyniès, A.; Schlicker, A.; Soneson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1350–1356. [[CrossRef](#)]
5. Bosset, J.-F.; Calais, G.; Mineur, L.; Maingon, P.; Stojanovic-Rundic, S.; Bensadoun, R.-J.; Bardet, E.; Beny, A.; Ollier, J.-C.; Bolla, M.; 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*, 184–190. [[CrossRef](#)]
6. Sainato, A.; Nunzia, V.C.L.; Valentini, V.; De Paoli, A.; Maurizi, E.R.; Lupattelli, M.; Aristei, C.; Vidali, C.; Conti, M.; Galardi, A.; et al. No benefit of adjuvant Fluorouracil Leucovorin chemotherapy after neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced cancer of the rectum (LARC): Long term results of a randomized trial (I-CNR-RT). *Radiother. Oncol.* **2014**, *113*, 223–229. [[CrossRef](#)]
7. Glynne-Jones, R.; Wyrwicz, L.; Tiret, E.; Brown, G.; Rödel, C.; Cervantes, A.; Arnold, D. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, iv22–iv40. [[CrossRef](#)]
8. Rödel, C.; Martus, P.; Papadopoulos, T.; Füzesi, L.; Klimpfinger, M.; Fietkau, R.; Liersch, T.; Hohenberger, W.; Raab, R.; Sauer, R.; et al. Prognostic Significance of Tumor Regression After Preoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 8688–8696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Sell, N.M.; Qwaider, Y.Z.; Goldstone, R.N.; Cauley, C.E.; Cusack, J.C.; Ricciardi, R.; Bordeianou, L.G.; Berger, D.L.; Kunitake, H. Ten-year survival after pathologic complete response in rectal adenocarcinoma. *J. Surg. Oncol.* **2021**, *123*, 293–298. [[CrossRef](#)]
10. Kasi, A.; Abbasi, S.; Handa, S.; Al-Rajabi, R.; Saeed, A.; Baranda, J.; Sun, W. Total Neoadjuvant Therapy vs Standard Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw. Open* **2020**, *3*, e2030097. [[CrossRef](#)]
11. Arnold, M.; Sierra, M.S.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **2017**, *66*, 683–691. [[CrossRef](#)]
12. Deng, S.; Calin, G.A.; Croce, C.M.; Coukos, G.; Zhang, L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 2643–2646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bartel, D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **2009**, *136*, 215–233. [[CrossRef](#)]
14. Djebali, S.; Davis, C.A.; Merkel, A.; Dobin, A.; Lassmann, T.; Mortazavi, A.; Tanzer, A.; Lagarde, J.; Lin, W.; Schlesinger, F.; et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* **2012**, *489*, 101–108. [[CrossRef](#)]
15. Gutschner, T.; Diederichs, S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 703–719. [[CrossRef](#)]
16. Galamb, O.; Barták, B.K.; Kalmár, A.; Nagy, Z.B.; Szigeti, K.A.; Tulassay, Z.; Igaz, P.; Molnár, B. Diagnostic and prognostic potential of tissue and circulating long non-coding RNAs in colorectal tumors. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 5026–5048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Li, Y.; Castellano, J.J.; Moreno, I.; Martínez-Rodenas, F.; Hernandez, R.; Canals, J.; Diaz, T.; Han, B.; Muñoz, C.; Biete, A.; et al. LincRNA-p21 Levels Relates to Survival and Post-Operative Radiotherapy Benefit in Rectal Cancer Patients. *Life* **2020**, *10*, 172. [[CrossRef](#)]
18. Necsulea, A.; Soumillon, M.; Warnefors, M.; Liechti, A.; Daish, T.; Zeller, U.; Baker, J.C.; Grützner, F.; Kaessmann, H. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *505*, 635–640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Washietl, S.; Kellis, M.; Garber, M. Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals. *Genome Res.* **2014**, *24*, 616–628. [[CrossRef](#)]
20. Yan, X.; Hu, Z.; Feng, Y.; Hu, X.; Yuan, J.; Zhao, S.D.; Zhang, Y.; Yang, L.; Shan, W.; He, Q.; et al. Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 529–540. [[CrossRef](#)]
21. Huarte, M.; Guttman, M.; Feldser, D.; Garber, M.; Koziol, M.J.; Kenzelmann-Broz, D.; Khalil, A.M.; Zuk, O.; Amit, I.; Rabani, M.; et al. A Large Intergenic Noncoding RNA Induced by p53 Mediates Global Gene Repression in the p53 Response. *Cell* **2010**, *142*, 409–419. [[CrossRef](#)]

22. Castellano, J.J.; Navarro, A.; Vinólas, N.; Marrades, R.M.; Moises, J.; Santanach, A.C.; Saco, A.; Muñoz, C.; Fuster, D.; Molins, L.; et al. LincRNA-p21 Impacts Prognosis in Resected Non-Small Cell Lung Cancer Patients through Angiogenesis Regulation. *J. Thorac. Oncol.* **2016**, *11*, 2173–2182. [[CrossRef](#)]
23. Yang, F.; Zhang, H.; Mei, Y.; Wu, M. Reciprocal Regulation of HIF-1 α and LincRNA-p21 Modulates the Warburg Effect. *Mol. Cell* **2014**, *53*, 88–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, G.; Li, Z.; Zhao, Q.; Zhu, Y.; Zhao, C.; Li, X.; Ma, Z.; Li, X.; Zhang, Y. LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for human colorectal cancer by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol. Rep.* **2014**, *31*, 1839–1845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhai, H.; Fesler, A.; Schee, K.; Fodstad, Ø.; Flatmark, K.; Ju, J. Clinical Significance of Long Intergenic Noncoding RNA-p21 in Colorectal Cancer. *Clin. Color. Cancer* **2013**, *12*, 261–266.
26. Dworak, O.; Keilholz, L.; Hoffmann, A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int. J. Color. Dis.* **1997**, *12*, 19–23. [[CrossRef](#)]
27. Campayo, M.; Navarro, A.; Benítez, J.C.; Santasusagna, S.; Ferrer, C.; Monzó, M.; Cirera, L. miR-21, miR-99b and miR-375 combination as predictive response signature for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206542. [[CrossRef](#)]
28. Robin, X.A.; Turck, N.; Hainard, A.; Tiberti, N.; Lisacek, F.; Sanchez, J.-C.; Muller, M.J. pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinform.* **2011**, *12*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Camp, R.L.; Dolled-Filhart, M.; Rimm, D.L. X-tile: A new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7252–7259. [[CrossRef](#)]
30. Chaleshi, V.; Irani, S.; Alebouyeh, M.; Mirfakhraie, R.; Aghdaei, H.A. Association of lincRNA-p53 regulatory network (lincRNA-p21, lincRNA-ROR and MALAT1) and p53 with the clinicopathological features of colorectal primary lesions and tumors. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 3937–3949.
31. Melo, C.A.; Léveillé, N.; Rooijers, K.; Wijchers, P.J.; Geeven, G.; Tal, A.; Melo, S.A.; De Laat, W.; Agami, R. A p53-bound enhancer region controls a long intergenic noncoding RNA required for p53 stress response. *Oncogene* **2016**, *35*, 4399–4406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jin, S.; Yang, X.; Li, J.; Yang, W.; Ma, H.; Zhang, Z. p53-targeted lincRNA-p21 acts as a tumor suppressor by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lee, H.; Kim, C.; Ku, J.-L.; Kim, W.; Yoon, S.K.; Kuh, H.-J.; Lee, J.-H.; Nam, S.W.; Lee, E.K. A long non-coding RNA snaR contributes to 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *Mol. Cells* **2014**, *37*, 540–546. [[CrossRef](#)]
34. Zhou, Q.; Zhan, H.; Lin, F.; Liu, Y.; Yang, K.; Gao, Q.; Ding, M.; Liu, Y.; Huang, W.; Cai, Z. LincRNA-p21 suppresses glutamine catabolism and bladder cancer cell growth through inhibiting glutaminase expression. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ning, Y.; Yong, F.; Haibin, Z.; Hui, S.; Nan, Z.; Guangshun, Y. LincRNA-p21 activates endoplasmic reticulum stress and inhibits hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 28151–28163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal representa una de las neoplasias más prevalentes, es el tercer tumor sólido más frecuente en hombres y el segundo en mujeres. El CR se puede considerar una entidad diferente a los tumores de colon, de hecho, representa aproximadamente un 35% de la incidencia total del cáncer colorrectal, con unos datos etiológicos y epidemiológicos que lo distinguen, y un comportamiento clínico que es diferente. Por lo tanto, su abordaje desde el punto de vista del tratamiento va a ser específico. Para un correcto y óptimo abordaje de los tumores de recto es necesaria una buena clasificación inicial de los mismos basada en la clasificación TNM. En este trabajo, vamos a centrarnos en el CRLA candidatos a una resección tras un tratamiento neoadyuvante o preoperatorio (cT3-4, cN0-1, M0)(25,48). La quimioterapia basada en fluoropirimidinas en concomitancia con radioterapia preoperatoria es el tratamiento estándar para estos pacientes con CRLA y su uso está muy extendido en la práctica clínica habitual(90,92). En los últimos 5 se han publicado diferentes estudios fases II o III que sugieren un beneficio de un abordaje con quimioterapia más intensiva asociada o no a radioterapia(104,105,109). El objetivo fundamental de esta estrategia terapéutica es conseguir una respuesta tumoral, “*downstaging*” en inglés, que permita una resección óptima del tumor con la preservación de los esfínteres y, por tanto, las menores comorbilidades posibles para los pacientes que se someten al tratamiento. Sin embargo, alrededor del 20-40% de los pacientes no responden a este tratamiento neoadyuvante(550). Los pacientes con un CRLA son explorados inicialmente con una endoscopia rectal que proporciona suficiente tejido para el diagnóstico y para los análisis moleculares antes del inicio del tratamiento. A pesar de la disponibilidad de muestras para el análisis molecular, actualmente no existen biomarcadores clínicamente validados para identificar correctamente a los pacientes que no responderán al tratamiento con QRT y, por tanto, se beneficiarán de forma clara de esta estrategia terapéutica antes que otra forma de abordaje del tumor primario. Existen estudios publicados en la última década que han demostrado una asociación entre los niveles de CEA sérico antes del tratamiento con la respuesta patológica completa (pCR) y la supervivencia (551,552), con la limitación que ello conlleva al ser biomarcadores inespecíficos. A pesar de esto, la selección de los pacientes todavía está basada en el estadio clínico de la enfermedad al diagnóstico y muchos pacientes son tratados de inicio con QRT, lo que puede comportar un retraso en la intervención quirúrgica debido a posibles toxicidades del tratamiento sistémico (553).

En este contexto de la búsqueda de biomarcadores que ayuden a comprender la biología del cáncer y predecir el pronóstico de los pacientes y la respuesta a diferentes tipos de tratamientos han emergido algunos tipos de ARN. Los ARN son pequeñas copias de ciertas partes del ADN, son los encargados de transportar la información genética para que se transforme en las proteínas que realicen una función determinada en el organismo(254). Sin embargo, únicamente el 1-2% del ADN va a traducirse a proteínas, lo que denominamos regiones codificantes y, en su conjunto se conoce como exoma(256). El 98% del genoma restante lo compone el material no codificante, que se ha comprobado que tiene un papel fundamental en la regulación génica. Una parte del genoma no codificante lo componen otros tipos de ARNs con función reguladora como los miRNA o los lncRNA, que tienen otro tipo de funciones que no requiere su traducción en proteínas(259). Se ha podido revelar que los ARNs no codificantes (ncRNAs) son fundamentales en el desarrollo de las enfermedades, sobre todo en cáncer(260). Juegan un papel central en la codificación, descodificación, regulación y expresión de los genes, así como en la interacción de unos genes con otros. La expresión desregulada de ncRNA y los procesos de señalización subsecuentes de las vías moleculares, están implicados directamente en el desarrollo y la progresión del cáncer(261,263,315). Dentro de los ncRNAs podemos distinguir diferentes clases o tipos según el tamaño de sus cadenas. Podemos destacar dos tipos fundamentales sobre los que se basará nuestro trabajo: los de pequeño tamaño, con cadenas unos 22 nucleótidos de longitud se denominan miRNAs; y, en el extremo opuesto en este ámbito, los lncRNA, que tienen un tamaño de más de 200 nucleótidos de longitud, en concreto destacaremos el lincRNA-p21 que ha sido estudiado en nuestro segundo trabajo. Por tanto, estos biomarcadores podrían ser buenos subrogados que nos ayuden a poder predecir el pronóstico o la respuesta a tratamientos en cáncer. En concreto, diversos estudios de este tipo de biomarcadores realizados en modelos *invitro* o *invivo* y con muestras de pacientes han demostrado que están implicados en los procesos biológicos y moleculares de los tumores de recto; sobre todo en tres ámbitos: 1) su expresión en el tejido tumoral, 2) su implicación pronóstica y, 3) su relación con la respuesta tumoral a tratamientos.

En esta tesis doctoral presentamos dos trabajos de investigación traslacional que han podido demostrar el valor de los ARN no codificantes, en concreto de una firma compuesta por 8 miRNA y de lincRNA-p21, como biomarcadores pronósticos y predictivos de la respuesta al

tratamiento preoperatorio con QRT de tumores de recto. El objetivo fundamental de ambos experimentos fue el estudio del valor predictivo de respuesta al tratamiento preoperatorio que nos permitiera una mejor selección de pacientes candidatos a QRT desde el análisis de la biopsia endoscópica inicial; ya que, el uso de estos biomarcadores podría ayudarnos a evitar posibles toxicidades y comorbilidades innecesarias que puedan retrasar el abordaje quirúrgico de la enfermedad, de gran importancia para la radicalidad del tumor.

En nuestro primer trabajo, definimos una firma de ocho miRNAs que caracteriza a los pacientes que presentan una respuesta completa (definido como TRG4 según la clasificación de Dworak) a QRT. El primer estudio se llevó a cabo en dos partes: una primera fase exploratoria, en la que se estudiaron 377 miRNAs utilizando un grupo de detección de 12 pacientes con respuestas bien caracterizadas y opuestas: 6 pacientes TRG0-1 o sin respuesta, frente a 6 pacientes TRG4 o completa. Entre los miRNAs estudiados en esta cohorte de descubrimiento, seleccionamos los miRNAs con mejor predicción de la respuesta. Se identificó una firma compuesta por: let-7b, let-7e, miR-21, miR-99b, miR-183, miR-328, miR-375 y miR-483-5p. Posteriormente, la firma de ocho miRNA fue validada en toda la cohorte de 96 pacientes de los que se había obtenido muestras preoperatorias al diagnóstico mediante endoscopia confirmando que miR-21, miR-99b, miR-375 y let-7b analizados están relacionados con la respuesta a la QRT. Demostramos que miR-21, miR-99b y miR-375 están regulados significativamente a la baja en los pacientes con una respuesta completa (TRG4) frente aquellos en los que la respuesta no fue completa (TRG0-3). Sin embargo, se pudo observar que los niveles de let-7b disminuyen lentamente a medida que aumenta el grado de respuesta, con los niveles más bajos en el grupo de pacientes TRG4. El objetivo principal del estudio era identificar aquellos pacientes con una respuesta extrema, por lo que nos centramos en los resultados de miR-21, miR-99b y miR-375. El análisis de la curva ROC indicó que estos 3 miRNA fueron capaces de predecir la respuesta a la QRT preoperatoria. Es importante destacar que la combinación de ellos, expresada como la suma de sus valores, tuvo el mejor valor de AUC con una sensibilidad del 60% y una especificidad del 82,9% para distinguir a los pacientes con la mejor respuesta de los otros grupos.

Se han publicado diferentes estudios en relación con nuestros resultados. La sobreexpresión de miR-21 se correlacionó con una respuesta incompleta en un estudio realizado sobre 76 biopsias de adenocarcinomas rectales antes de la QRT neoadyuvante(554). Sin embargo,

otros estudios demostraron lo contrario, es decir, una sobreexpresión de miR-21 está correlaciona con la regresión tumoral completa como apoyan nuestros resultados(384,555). En Eriksen *et al.* (555), que estudiaron la mayor cohorte de pacientes, demostraron que miR-21 se regulaba a la baja en aquellos pacientes que respondieron en la cohorte exploratoria (n = 55, p = 0,062) mientras que se reguló al alza en los que respondieron en la cohorte de validación (n = 130, p = 0,035). Esto indica que el papel de miR-21 en la respuesta preoperatoria de QRT no es claro y debe estudiarse más a fondo. De acuerdo con nuestros resultados, otros estudios *in vitro* han mostrado que miR-21 se sobreexpresa en líneas celulares de tumores colorrectales(556) resistentes a 5-FU. miR-21 es uno de los miRNAs aberrantes observados con mayor frecuencia en cáncer y fue uno de los primeros miRNAs que se describe como oncomir. Un análisis de miRNAs a gran escala en 540 muestras en seis tipos diferentes de tumores sólidos ha demostrado que miR-21 era el único miARN regulado positivamente en todos los tipos de cáncer. miR-21 actúa sobre el gen supresor *PTEN* permitiendo una mayor proliferación y capacidad de invasión celular(334). También se ha relacionado con transcritos que codifican reguladores negativos de la señalización de *RAS*, conllevando a un aumento de la proliferación y disminución de la apoptosis(332). Más allá de la respuesta a tratamiento, miR-21 se ha relacionado como biomarcador pronóstico en CCR, a pesar de que no obtuvimos dicho resultado en nuestra serie. Un estudio analizó 1.141 casos de CCR con microArrays para identificar el impacto de 121 tipos de miRNA en el estadio de la enfermedad y los resultados de supervivencia(376), en las muestras de CR se identificaron 13 miRNAs asociados significativamente con la mortalidad tras el diagnóstico de cáncer, en concreto se relacionó la expresión de miR-21 de forma inversa a la mortalidad de los pacientes con CR, pero no con tumores de colon(376). Además de los tumores de recto y CCR, miR-21 se ha relacionado con otros tipos tumorales ya que se sobreexpresa en el linfoma de células pre-B y se ha relacionado con tumores sólidos como el cáncer de pulmón, mama, ovario, tiroides, próstata, páncreas y glioblastoma(332,333).

En referencia a otro de los miRNA estudiados, miR-99b, nuestros resultados demostraron que niveles bajos al diagnóstico en el tejido tumoral están relacionados con una respuesta completa a la QRT. En otros estudios publicados se ha podido comprobar que miR.99b aumenta después del tratamiento con 5-FU y que está involucrado la regulación de diversos procesos biológicos y pueden variar según el contexto celular y el tipo de tejido. miR99b

participa en la regulación de la autofagia en células HT-29(557). La autofagia se relaciona cada vez más como una respuesta celular favorable a la supervivencia que se activa en momentos de estrés durante la quimioterapia(558) y, por tanto, puede implicar la resistencia a la quimioterapia. En este contexto, la radiación ionizante que se produce con el tratamiento con radioterapia puede promover la expresión y activación de la vía mTOR reduciendo la expresión de miR-99b(559) como se vio en un estudio con líneas celulares de cáncer de páncreas, sugiriendo que niveles altos de miR-99b están relacionados con la resistencia a radioterapia. Las dianas de miR-99b incluyen la vía de señalización mTOR, un regulador central del crecimiento celular, la proliferación y el metabolismo cuya inhibición se ha relacionado previamente en células de cáncer de mama con un aumento en la autofagia(560) y con una peor supervivencia del paciente al aumentar el potencial de proliferación celular vía mTOR1(561). Es decir, la supresión de mTOR por miR-99b puede influir en la respuesta celular a la disponibilidad de nutrientes y el estrés celular(562); en concreto, dentro de la vía mTOR, miR-99b se ha asociado con la regulación específica de mTORC1, que juega un papel importante en el control de la síntesis de proteínas y el crecimiento celular como en un estudio que demostró asociación con una peor supervivencia de pacientes afectos de cáncer de mama, en especial aquellos con receptores hormonales positivos y sin expresión de HER2(563). Es interesante destacar que miR-99b también regula la vía de señalización PI3K/Akt al apuntar a genes involucrados en esta ruta con impacto en el crecimiento y la apoptosis celular(562). En nuestros experimentos miR-99b no se relacionó de forma significativa con los resultados de supervivencia.

En relación con miR-375, pudimos demostrar que niveles bajos de dicho miRNA en la biopsia basal se relaciona con una respuesta completa a QRT preoperatoria; además, pudimos observar una tendencia a peor tiempo libre de enfermedad en pacientes que presentaban bajos niveles tumorales de miR-375. Por otro lado, la sobreexpresión de miR-375 se ha relacionado con otros tumores como el cáncer gástrico recurrente(564). Pero no sólo directamente con la aparición de cáncer, sino que la sobreexpresión de miR-375 se ha relacionado en algunos estudios previos al nuestro con la resistencia a terapias oncológicas como la radiación ionizante y el tratamiento con etopósido, como se observó en un experimento con líneas celulares de cáncer gástrico, y que actúa a través de la regulación de p53(565). miR-375 regula negativamente la expresión de p53, lo que significa que cuando miR-375 está

sobreexpresado, puede disminuir los niveles de proteína p53 en las células. Esto es relevante al tratarse de uno de los supresores tumorales más importantes del genoma, implicado en la inducción de la detención del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN en respuesta al estrés celular y al daño en el ADN(444,566,567). Además, en las líneas celulares de cáncer de cuello uterino, la sobreexpresión de miR-375 se ha relacionado con la resistencia a paclitaxel(568). También demuestra un papel de resistencia en otros tumores como en el cáncer de colon, donde miR-375 aporta resistencia a cetuximab a través de la regulación de la vía AKT al dirigirse al gen supresor tumoral PHLPP1(569). También se ha relacionado con la diferenciación y el desarrollo de tumores neuroendocrinos intestinales(570) o pulmonares(571), que presenta clínicamente resistencia a quimioterapia. Estos datos están en concordancia con los reportados por Conde-Muiño et al., que describieron que miR-375, a través de la regulación de cMyc, tiene un papel en la quimio resistencia al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto localmente avanzado(572). Todos ellos en línea con los que podemos observar en los pacientes de nuestra serie que no responden al tratamiento, los cuales presentan niveles elevados de miR-375.

Por último, demostramos que la disminución progresiva de niveles de let-7b se relacionan con una respuesta al tratamiento con QRT previa a la resección de los tumores de recto. Además, niveles bajos de let-7e se relacionaron en nuestros experimentos con una peor SLE y una peor SG, de hecho, fue el único biomarcador que mostró tener una relación con los resultados de SG de nuestros pacientes. Se sabe que la familia let-7 regula muchos factores de la transcripción implicados de manera importante en el control del ciclo celular, de la diferenciación celular y de la apoptosis(573). Los miembros de la familia let-7 se han asociado previamente con el pronóstico en múltiples tumores, incluido el cáncer de mama hormono dependiente y el cáncer colorrectal(573,574). Se ha demostrado que la expresión de Let-7e se reduce significativamente en células de cáncer epitelial de ovario humano resistentes al cisplatino, y la sobreexpresión de let-7e por transfección de let-7e Agomir, un tipo de miRNA de doble cadena modificado químicamente que imita a let-7e, reduce la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia al cisplatino, incluidas EZH2 y ciclina D1, y revierte la resistencia al cisplatino cuando se inyecta localmente en tumores de xenoinjerto de este mismo tipo tumoral. Además, altos niveles de expresión de let-7e se han correlacionado en otros trabajos con una mejor respuesta a la QRT(381). Estos resultados

están en línea con los obtenidos en la fase de selección de nuestro estudio, donde observamos que los pacientes respondedores (TRG4) presentaban niveles de let-7e más altos. A pesar de que no pudimos validar este resultado en toda la cohorte para la respuesta al tratamiento. Estos resultados pueden estar en relación con las diferentes vías de señalización en las que se ve implicada la familia let, como en los genes de la vía PI3K/Akt/mTOR(575) en relación con la autofagia y la proliferación celular entre otros procesos biológicos, la vía de señalización Wnt y por tanto la diferenciación celular(576) o la vía de TP53(577).

miR-328 es un gen de ARN asociado principalmente con el cáncer de pulmón y su gen codificante se encuentra en 16q22.1(578). Se ha observado la expresión de miR-328 en tejidos de pulmón y esófago basado en estudios de secuenciación de ARN(579). Pero no solo se ha encontrado una desregulación al alza o a la baja de miR-328 en cáncer de pulmón no célula pequeña(578,579), sino también en tumores neuroendocrinos(580), en tumores de próstata(581), melanoma(582), gliomas(583), hepatocarcinoma(584) y en CCR(585,586). Sin embargo, el papel de miR-328 en los diferentes tipos tumorales no está del todo claro, ya que está implicado en numerosas vías biológicas y según en la vía molecular en la que se participe podrá favorecer la progresión(586) o inhibirla(585) y por tanto significar un mejor o peor pronóstico. Por ejemplo, estudios con líneas celulares de CPNCP encontraron que una sobreexpresión de miR-328 se asociaba a un aumento de la migración celular y a la aparición de metástasis en sistema nervioso central(578). Otro ejemplo en el que también se ha relacionado a miR-328 con un papel en la invasión celular lo demostró un estudio con líneas celulares de glioma; miR-328 es capaz de regular *SFRP1* (Secreted Frizzled-related protein 1, en inglés) y la actividad de la vía Wnt, al ser éste un inhibidor de la misma(583). Es interesante destacar que también se ha asociado a CCR, en concreto, en un estudio realizado con muestras de pacientes previas a la cirugía del tumor primario. El experimento demostró que un ARN circulante, circCAMSAP1, atrae a miR-328 e impide su acción como supresor del factor de transcripción E2F1 con el resultado final de la progresión tumoral(586). Por tanto, la regulación a la baja de miR-328 se relaciona con mal pronóstico en CCR como demuestran muchos otros estudios, datos que van en el mismo sentido que nuestros resultados, donde pudimos observar que una menor expresión de miR-328 en muestras de endoscopia diagnóstica se asociaba a peor SLE. En este escenario hay otros estudios que muestran resultados similares y demuestran como miR-328 actúa a través de diferentes vías

moleculares; Pan S. *et al.* demostraron que la sobreexpresión de miR-328-3p inhibe la proliferación celular, la migración, la invasión, y la activación de EMT a través de su participación en la vía PI3K/Akt, al unirse directamente a 3'UTR de Girdin y regular negativamente la activación de la vía(585). También se ha demostrado la participación de miR-328 en otras vías moleculares como TGFβ2 en líneas celulares de melanoma, en un estudio que mostró un aumento de los niveles de TGFβ2 con una correlacionaron inversamente con el nivel de expresión de miR-328(582). Pero podemos encontrar otros estudios en el sentido contrario, podemos destacar un trabajo en el que se asoció la expresión de miR-328 a un aumento significativo en muestras de tejido de HCC inhibiendo la capacidad de invasión y proliferación celular a través de la apoptosis celular y la detención del ciclo celular en la fase G0/G1. Este mismo estudio demostró que PTEN era un gen diana de miR-328(584). Por último, no solo debemos hablar del papel pronóstico de miR-328, sino de su implicación en la sensibilidad a fármacos. Liu C. *et al.* mostraron que la proteína quinasa 6 activada por p21 (PAK6) está sobre expresada en cáncer de próstata primario y avanzado. Los autores demostraron la sobreexpresión de dicha proteína en tumores resistentes a la castración y que dicha sobreexpresión estaba regulada por miR-328. La expresión de miR-328 mejoró la sensibilidad a docetaxel, inhibió la proliferación celular y promovió la apoptosis celular sin afectar el ciclo celular(581).

Sin embargo, hay diversos miRNA no encontrados en nuestro estudio y que otros trabajos previos, con un menor número de pacientes de CRLA, han correlacionado con la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, la sobreexpresión de miR-31 se ha observado en pacientes con una pobre respuesta y con una peor SG(360); otro estudio analizó 38 pacientes tratados con capecitabina y oxaliplatino y radioterapia, demostró que miR-622 y miR-630 tienen una sensibilidad y una especificidad del 100 % en la selección de aquellos pacientes con la máxima respuesta(587).

En nuestro segundo trabajo hemos demostrado que los niveles de expresión de lincRNA-p21 en tejido tumoral de biopsias de pacientes no tratados que padecen un tumor rectal se pueden usar potencialmente como un marcador predictivo de la respuesta a la QRT y como un biomarcador pronóstico de tiempo a la recaída. Los niveles más altos de lincRNA-p21 se encontraron en pacientes con un estadio III antes del tratamiento con QRT; curiosamente, después del tratamiento con QRT, los niveles más altos de lincRNAp21 lo mostraron los

pacientes que presentaban el estadio patológico III, y los niveles más bajos aquellos pacientes con ypT0N0 (respuesta patológica completa). De hecho, se observaron niveles más altos de lincRNA-p21 en pacientes con ypT3–4 y en pacientes con ypN1–2. Estos resultados están en consonancia con estudios anteriores realizados con tumores colorrectales(545,549). En una cohorte de 66 pacientes con CCR, incluido el 39% (26/66) de CR(545), niveles altos de lincRNA-p21 se asociaron con factores de mal pronóstico, como un estadio más avanzado (estadio III frente a I), el tamaño tumoral (pT) y la invasión vascular(545). En otro estudio, Li y colaboradores analizaron 177 muestras de tumores de CCR procedentes de una resección quirúrgica, de las cuales 81 (45,7%) fueron tumores de recto; se demostró que lincRNA-p21 era un marcador de enfermedad avanzada, ya que se observaron niveles más altos de lincRNA-p21 en pacientes en estadio III y en pacientes N +, además de una peor supervivencia(549). Sin embargo, aunque estos resultados están en línea con los nuestros, debemos tener en cuenta que en nuestro análisis la población de CR es diferente, es decir, los pacientes recibieron tratamiento con QRT antes de la cirugía y este grupo de pacientes fue excluido de los estudios citados anteriormente.

En segundo lugar, observamos que se encontraron niveles más bajos de lincRNA-p21 en aquellos pacientes que presentaron una reducción del estadio del tumor y una respuesta patológica completa después del tratamiento con QRT. Este hallazgo es de gran importancia ya que, como se ha destacado anteriormente, actualmente no disponemos de biomarcadores validados que identifiquen aquellos pacientes no respondedores. a pesar de la suficiente disponibilidad de muestras tomadas mediante endoscopia rectal previas al tratamiento. LincRNA-p21 demostró ser un biomarcador predictivo de la respuesta a la QRT y, cuando se comparó con otros factores predictivos en el momento del diagnóstico que se usan en la práctica habitual, como el estadio inicial o los niveles séricos de CEA, se mostró como un factor predictivo independiente. Uno de los aspectos fundamentales a la hora de comprender mejor el papel de un marcador como factor predictivo es su relación biológica con las terapias que se van a utilizar. El tratamiento preoperatorio del CRLA se basa en la combinación de radioterapia locorregional y quimioterapia, en nuestra cohorte 5-fluorouracilo. Wang *et al.* llevaron a cabo un estudio *in vitro* con el objetivo de evaluar el papel de lincRNA-p21 en la respuesta a la radioterapia(588); en contraste con nuestros resultados, describieron que el nivel de expresión de lincRNA-p21 puede afectar a la sensibilidad a la radioterapia. En este

estudio, los autores observaron que después del tratamiento con rayos X, los niveles de lincRNA-p21 aumentaron en dos líneas celulares de cáncer colorrectal, SW1116 y LOVO. Cuando los investigadores sobre expresaron lincRNA-p21 en la línea celular SW1116 y trataron las células con rayos X, observaron una mayor tasa de apoptosis que en las células de control; sin embargo, este resultado no fue validado cuando silenciaron lincRNAp21 antes del tratamiento con rayos X en la misma línea celular (no se observaron diferencias en la tasa de apoptosis entre el grupo silenciado y el de control). Otro estudio ha demostrado resultados similares, sin embargo, utilizando una cohorte diferente de pacientes (pacientes con CCR reseado que no recibieron tratamiento neoadyuvante)(549). En este estudio se observó que los pacientes con tumores con alta expresión de lincRNA-p21 presentaban un mayor beneficio de la QRT como terapia adyuvante (SG más prolongada en comparación con los pacientes que no recibieron QRT después de la resección quirúrgica(549)). No obstante, estos resultados no son comparables con el presente trabajo ya que nuestra correlación se obtuvo en tejido tumoral aislado antes de la administración del tratamiento adyuvante con QRT. Además, las dos referencias anteriores se centraron en el papel potencial de lincRNA-p21 y la respuesta a la radioterapia en relación con su papel en la vía p53(444,445,490,589); sin embargo, no podemos ignorar que los pacientes con cáncer de recto incluidos en la cohorte también recibieron tratamiento con 5-fluorouracilo. Lee *et al.* analizaron el patrón de lincRNA en líneas celulares de cáncer de colon resistentes a 5-fluorouracilo y observaron que lincRNA-p21 estaba significativamente regulado al alza en células SNU-C5 resistentes a 5-FU en comparación con su línea celular original(590). Esto proporciona información importante sobre la participación de lincRNA-p21 en la resistencia al 5-FU de las células de cáncer de colon y nos permite especular que las mejores tasas de respuesta observadas en los pacientes con niveles bajos de lincRNA-p21 de nuestra serie podrían estar asociadas con, al menos parcialmente, una mayor sensibilidad al 5-fluorouracilo. El papel de lincRNA-p21 en la resistencia al 5-fluorouracilo y su efecto cuando el 5-FU se combina con radioterapia merece ser objeto de estudio en futuras líneas de investigación relacionadas con nuestra serie. Además del valor predictivo de respuesta, estudiamos el papel potencial de los 8 miRNAs encontrados en la fase exploratoria del primer estudio y de LincRNA-p21 como biomarcadores pronósticos de los pacientes. En este contexto, encontramos diferencias significativas en SLE con respecto a la expresión de let-7e y miR-328 y diferencias

significativas en SG según la expresión de let-7e. Además, los pacientes con niveles bajos de miR-375 (que se correlacionaba con una mejor respuesta) tenían una tendencia a una mejor SLE. Curiosamente, let-7e y miR-328 surgieron como factores pronósticos independientes para DFS y OS en el análisis multivariado. Los pacientes con niveles altos de miR-328 y aquellos pacientes con niveles bajos de let-7e tuvieron una SLE y una SG más cortas. Finalmente, encontramos una correlación entre la alta expresión de los niveles de lincRNA-p21 y el tiempo a la recidiva más corto. En este sentido, los niveles altos de lincRNA-p21 se han relacionado previamente con un peor pronóstico en el CCR(549) y también en otros tumores sólidos como el cáncer de pulmón de células no pequeñas(495), el carcinoma de vejiga(591) o el carcinoma hepatocelular(592). En relación con el CCR, Li et al. observó que lincRNA-p21 es un marcador de enfermedad avanzada y peor supervivencia, especialmente para RC donde los niveles altos de lincRNA-p21 se vincularon con un TLE más corto y una SG más corta(549).

Somos conscientes de que ambos estudios tienen varias limitaciones, incluido el pequeño número de muestras analizadas (n= 96 y n = 70, respectivamente), que podría afectar la solidez de los análisis multivariantes. Además, una limitación adicional es que tanto los miRNAs como lincRNA-p21 se analizaron en una cohorte retrospectiva de muestras incluidas en parafina. Sin embargo, cabe poner en valor la falta de estudios de muestras de pacientes con biopsias endoscópicas y la dificultad del análisis de este tipo de biomarcadores en muestras parafinadas de tumores. Los resultados obtenidos en el análisis multivariante son informativos, pero necesitan ser validados en una cohorte mayor. No obstante, no se han publicado estudios relacionados para cohortes de pacientes CR en entornos neoadyuvantes, y nuestro estudio puede proporcionar nueva evidencia de las vías epigenéticas relacionadas con la respuesta tumoral a la QRT.

CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral hemos identificado diferentes biomarcadores epigenéticos analizados en muestras recogidas por endoscopia al diagnóstico de un tumor rectal localmente avanzado. Dichos biomarcadores demostraron estar implicados en la respuesta a la quimio-radioterapia preoperatoria y ser marcadores pronósticos de los pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.

- 1- miR-21, miR-99b, miR-375, let-7b, let-7e, miR-183, miR-328, miR-483 y lincRNA-p21 están presentes en muestras endoscópicas recogidas al diagnóstico de tumores rectales.
- 2- miR-21, miR-99b, miR-375, let-7b y lincRNA-p21 demuestran ser biomarcadores subrogados predictivos de respuesta a quimio-radioterapia en pacientes con cáncer de recto no tratados, evitando el retraso de la resección y las comorbilidades innecesarias.
 - a. Aquellos pacientes con tumores que presentan altos niveles de expresión de lincRNA-p21 y bajos niveles de miR-21, miR-99b y miR-375 al diagnóstico tienen beneficio de un tratamiento preoperatorio con quimio-radioterapia, al presentar una mejor respuesta al tratamiento y un mejor “downstaging” en el caso de lincRNA-p21. En el caso de let-7b se demostró que los niveles de dicho miRNA descienden progresivamente con la respuesta tumoral hasta llegar a TRG4.
 - b. Las curvas ROC para predecir respuesta a tratamiento de lincRNA-p21 y de la combinación de miR-21, miR-99b y miR-375 demostraron un AUC de 0.69 y 0.66, respectivamente.
- 3- Además de ser predictivo, lincRNA-p21 tiene un valor pronóstico para supervivencia. Let-7e y miR-328 demostraron ser también biomarcadores subrogados de supervivencia.
 - a. Los pacientes que presentan altos niveles de lincRNA-p21 en muestras tumorales al diagnóstico presentarán un menor tiempo a la recidiva. Niveles altos de lincRNA-p21 se han observado en aquellos tumores con mayor estadiaje (estadio III) entre los que definen los tumores de recto localmente avanzados.
 - b. Let-7e demostró ser el único biomarcador relacionado con supervivencia libre

de enfermedad y supervivencia global, en concreto, niveles bajos de expresión de let-7e se asociaron a peores resultados de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. miR-328 sólo se asoció a una peor supervivencia libre de enfermedad cuando se encuentra en bajos niveles de expresión.

Los resultados presentados deben tomarse con cautela ya que se trata de un estudio retrospectivo y deben confirmarse en un estudio prospectivo. Sin embargo, los biomarcadores identificados, siguiendo la línea de los resultados de diferentes trabajos en este ámbito, podrían ser biomarcadores subrogados que representan una valiosa herramienta adicional para individualizar el tratamiento en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado, evitando el retraso en el tratamiento quirúrgico y posibles toxicidades y/o comorbilidades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4): 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
2. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*. 2015;385(9972): 977–1010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9).
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(1): 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
4. Kerr J, Anderson C, Lippman SM. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. *The Lancet Oncology*. 2017. e457–e471. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30411-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30411-4).
5. Viner B, Barberio AM, Haig TR, Friedenreich CM, Brenner DR. The individual and combined effects of alcohol consumption and cigarette smoking on site-specific cancer risk in a prospective cohort of 26,607 adults: results from Alberta’s Tomorrow Project. *Cancer Causes and Control*. 2019;30(12): 1313–1326. <https://doi.org/10.1007/S10552-019-01226-7>.
6. Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E, Clancy TE, Zhang X, Cai D, et al. Analysis of Fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science*. 2017;358(6369): 1443–1448. <https://doi.org/10.1126/science.aal5240>.
7. Kirkegaard H, Johnsen NF, Christensen J, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: A prospective Danish cohort study. *BMJ (Online)*. 2010;341(7780): 978. <https://doi.org/10.1136/bmj.c5504>.
8. Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Fedirko V, Norat T, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC medicine*. 2014;12(1). <https://doi.org/10.1186/S12916-014-0168-4>.
9. Illescas O, Rodriguez-Rosa M, Garibolli M. Mediterranean Diet to Prevent the Development of Colon Diseases: A Meta-Analysis of Gut Microbiota Studies. *Nutrients*. 2021;13(7): 2234. <https://doi.org/10.3390/NU13072234>.
10. Murphy N, Norat T, Ferrari P, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Skeie G, et al. Dietary fibre intake and risks of cancers of the colon and rectum in the European prospective investigation into cancer

- and nutrition (EPIC). *PloS one*. 2012;7(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039361>.
11. Willemsen RF, McNeil J, Heer E, Johnson ST, Friedenreich CM, Brenner DR. Dietary patterns with combined and site-specific cancer incidence in Alberta's Tomorrow Project cohort. *European journal of clinical nutrition*. 2021; <https://doi.org/10.1038/S41430-021-00958-7>.
 12. Maximova K, Moez EK, Dabravolskaj J, Ferdinands AR, Dinu I, Siou G Lo, et al. Co-consumption of vegetables and fruit, whole grains, and fiber reduces the cancer risk of red and processed meat in a large prospective cohort of adults from Alberta's tomorrow project. *Nutrients*. 2020;12(8): 1–21. <https://doi.org/10.3390/NU12082265>.
 13. Sankaranarayanan R, Kumar DR, Altinoz MA, Bhat GJ. Mechanisms of Colorectal Cancer Prevention by Aspirin-A Literature Review and Perspective on the Role of COX-Dependent and -Independent Pathways. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(23): 1–18. <https://doi.org/10.3390/IJMS21239018>.
 14. Yaqian Feng, Lei Tao, Guoqiang Wang, Zhen Li, Mingming Yang, Weishen He, et al. Aspirin inhibits prostaglandins to prevents colon tumor formation via down-regulating Wnt production. *European journal of pharmacology*. 2021;906. <https://doi.org/10.1016/J.EJP HAR.2021.174173>.
 15. Tomohiro Aoki, Shuh Narumiya. Prostaglandin E 2-EP2 signaling as a node of chronic inflammation in the colon tumor microenvironment. *Inflammation and regeneration*. 2017;37(1). <https://doi.org/10.1186/S41232-017-0036-7>.
 16. Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whitfield K, Krstic G, Wetterslev J, et al. Vitamin D supplementation for prevention of cancer in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014;2014(6). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007469.PUB2>.
 17. Pablo Hernández-Alonso, Silvia Canudas, Hatim Boughanem, Estefanía Toledo, Jose V. Sorlí, Ramón Estruch, et al. Dietary vitamin D intake and colorectal cancer risk: a longitudinal approach within the PREDIMED study. *European journal of nutrition*. 2021; <https://doi.org/10.1007/S00394-021-02585-1>.
 18. Burn J, Gerdes AM, MacRae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2011;378(9809): 2081–2087. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61049-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61049-0).
 19. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rö Del C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2017;28:

Suppl 4; iv22–iv40. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx224>.

20. J. Balmaña F, Balaguer A, Cervantes D, Arnold. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of oncology*. 2013;24 Suppl 6. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDT209>.
21. DeVita VT, Rosenberg SA, Lawrence TS. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles and practice of oncology / editors: Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, Steven A. Rosenberg. Philadelphia : Wolters Kluwer,; 2019.
22. Carmichael JC, Mills S. Anatomy and Embryology of the Colon, Rectum, and Anus. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery*. 2016; 3–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25970-3_1.
23. *e-Sobotta* | <https://www.sobotta.com/> [Accessed 24th July 2021].
24. Catinean A, Balan GG, Mezei A, Botan EC, Mitre AO, Motocu R, et al. Endoscopic Ultrasound Elastography in the Assessment of Rectal Tumors: How Well Does It Work in Clinical Practice? *Diagnostics 2021, Vol. 11, Page 1180*. 2021;11(7): 1180. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS11071180>.
25. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Annals of surgical oncology*. 2018;25(6): 1454–1455. <https://doi.org/10.1245/S10434-018-6462-1>.
26. Roland Moll, Ralf Zimbelmann, Michaela D. Goldschmidt, Martina Keith, Jürgen Laufer, Michael Kasper, et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation; research in biological diversity*. 1993;53(2): 75–93. <https://doi.org/10.1111/J.1432-0436.1993.TB00648.X>.
27. Michael S. Landau, Shih-Fan Kuan, Simon Chiosea, Reetesh K. Pai. BRAF-mutated microsatellite stable colorectal carcinoma: an aggressive adenocarcinoma with reduced CDX2 and increased cytokeratin 7 immunohistochemical expression. *Human pathology*. 2014;45(8): 1704–1712. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2014.04.008>.
28. Werling, Robert W., Yaziji, Hadi, Bacchi, Carlos E., Gown, Allen M. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2003;27(3): 303–310. <https://doi.org/10.1097/00000478-200303000-00003>.
29. American Pathologists Colleague. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. 2017; www.cap.org/cancerprotocols.
30. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO

- classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2): 182.
<https://doi.org/10.1111/HIS.13975>.
31. Green, Johnny B., Timmcke, Alan E., Mitchell, William T., Hicks, Terrel C., Gathright, Byron J., Ray, John E. Mucinous carcinoma--just another colon cancer? *Diseases of the colon and rectum*. 1993;36(1): 49–54. <https://doi.org/10.1007/BF02050301>.
 32. G.B. Secco, R. Fardelli, E. Campora, G. Lapertosa, R. Gentile, S. Zoli, C. Prior. Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology*. 1994;51(1): 30–34. <https://doi.org/10.1159/000227306>.
 33. *Colloid carcinoma of the colon and rectum*. <https://acsjournals-onlinelibrary-wiley-com.sire.ub.edu/doi/epdf/10.1002/1097-0142%2819871215%2960%3A12%3C3103%3A%3AAID-CNCR2820601241%3E3.0.CO%3B2-6> [Accessed 4th October 2021].
 34. Minsky B. Clinicopathologic impact of colloid in colorectal carcinoma. *Diseases of the colon and rectum*. 1990;33(8): 714–719. <https://doi.org/10.1007/BF02150752>.
 35. Consorti F, Lorenzotti A, Midiri G, Paola DI. Prognostic Significance of Mucinous Carcinoma of Colon and Rectum: A Prospective Case-Control Study. *Journal of Surgical Oncology* 2000;73: 70–74. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9098\(200002\)73:2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9098(200002)73:2).
 36. Nitsche U, Zimmermann A, Späth C, Müller T, Maak M, Schuster T, et al. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Annals of surgery*. 2013;258(5): 775–783. <https://doi.org/10.1097/SLA.0B013E3182A69F7E>.
 37. Ui Sup Shin, Chang Sik Yu, Jong Hoon Kim, Tae Won Kim, Seok-Byoung Lim, Sang Nam Yoon, et al. Mucinous rectal cancer: effectiveness of preoperative chemoradiotherapy and prognosis. *Annals of surgical oncology*. 2011;18(8): 2232–2239. <https://doi.org/10.1245/S10434-011-1612-8>.
 38. D-W Lee, S-W Han, H J Lee, Y-Y Rhee, J M Bae, N-Y Cho, et al. Prognostic implication of mucinous histology in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *British journal of cancer*. 2013;108(10): 1978–1984. <https://doi.org/10.1038/BJC.2013.232>.
 39. N. Hugen, R.H.A. Verhoeven, S.A. Radema, I.H.J.T. de Hingh, J.F.M. Pruijt, I.D. Nagtegaal, et al. Prognosis and value of adjuvant chemotherapy in stage III mucinous colorectal carcinoma. *Annals of oncology*. 2013;24(11): 2819–2824. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDT378>.
 40. Nissan A, Guillem JG, Paty PB, Wong DW, Cohen A. Signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: a matched control study. *Diseases of the colon and rectum*. 1999;42(9): 1176–1180. <https://doi.org/10.1007/BF02238570>.

41. Psathakis D, Schiedeck T.H.K, Krug F, Oevermann E, Kujath P, Bruch H-P. Ordinary colorectal adenocarcinoma vs. primary colorectal signet-ring cell carcinoma: study matched for age, gender, grade, and stage. *Diseases of the colon and rectum*. 1999;42(12): 1618–1625.
<https://doi.org/10.1007/BF02236218>.
42. Frizelle, F., Hobday K. S., Batts K. P., Nelson H. Adenosquamous and squamous carcinoma of the colon and upper rectum: a clinical and histopathologic study. *Diseases of the colon and rectum*. 2001;44(3): 341–346. <https://doi.org/10.1007/BF02234730>.
43. Masoomi H, Ziogas A, Lin BS, Barleben A, Mills S, Stamos MJ, et al. Population-based evaluation of adenosquamous carcinoma of the colon and rectum. *Diseases of the colon and rectum*. 2012;55(5): 509–514. <https://doi.org/10.1097/DCR.0B013E3182420953>.
44. Petrelli NJ., Valle AA., Weber TK., Rodriguez-Bigas M. Adenosquamous carcinoma of the colon and rectum. *Diseases of the colon and rectum*. 1996;39(11): 1265–1268.
<https://doi.org/10.1007/BF02055120>.
45. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic Factors in Colorectal Cancer College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2000;124(7): 979–994. <https://doi.org/10.5858/2000-124-0979-PFICC>.
46. Benson AB, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, Cohen S, et al. NCCN Guidelines Version 1.2021 Rectal Cancer Version 1.; *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021.
47. Nagawa Hirokazu, Muto Tetsuichiro, Sunouchi Koki, Higuchi Yoshiki, Tsurita Giichiro, Watanabe Toshiaki, et al. Randomized, controlled trial of lateral node dissection vs. nerve-preserving resection in patients with rectal cancer after preoperative radiotherapy. *Diseases of the colon and rectum*. 2001;44(9): 1274–1280. <https://doi.org/10.1007/BF02234784>.
48. Iris D. Nagtegaal, Phil Quirke, Hans-Joachim Schmoll. Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nature reviews. Clinical oncology*. 2011;9(2): 119–123.
<https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2011.157>.
49. Amin MB, Frederick, Greene L, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge From a Population-Based to a More ‘Personalized’ Approach to Cancer Staging. *CA: Cancer Journal for Clinicians*.
<https://doi.org/10.3322/caac.21388>.

50. Greene Frederick L., Stewart AK., Norton HJ. A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Annals of surgery*. 2002;236(4): 416–421. <https://doi.org/10.1097/0000658-200210000-00003>.
51. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, Hundahl SA, Estes NC, Ajani JA, et al. Updated Analysis of SWOG-Directed Intergroup Study 0116: A Phase III Trial of Adjuvant Radiochemotherapy Versus Observation After Curative Gastric Cancer Resection. *Journal of clinical oncology*. 2012;30: 2327–2333. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.7136>.
52. Phil Quirke, Robert Steele, John Monson, Robert Grieve, Subhash Khanna, Jean Couture, et al. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet*. 2009;373(9666): 821–828. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60485-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60485-2).
53. Iris D. Nagtegaal , Cornelis J.H. van de Velde , Erik van der Worp , Ellen Kapiteijn , Phil Quirke , J. Han J.M. van Krieken. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist in quality control. *Journal of clinical oncology*. 2002;20(7): 1729–1734. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.07.010>.
54. Tilly Camille, Lefèvre JH., Svrcek Magali, Shields C, Fléjou J-F, Tiret E, et al. R1 rectal resection: look up and don't look down. *Annals of surgery*. 2014;260(5): 794–800. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000988>.
55. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *International Journal of Colorectal Disease*. 1997;12(1): 19–23. <https://doi.org/10.1007/s003840050072>.
56. Monique Maas, Patty J Nelemans, Vincenzo Valentini, Prajnan Das, Claus Rödel, Li-Jen Kuo, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet. Oncology*. 2010;11(9): 835–844. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70172-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70172-8).
57. Bonnetain F, Bosset JF, Gerard JP, Calais G, Conroy T, Mineur L, et al. What is the clinical benefit of preoperative chemoradiotherapy with 5FU/leucovorin for T3-4 rectal cancer in a pooled analysis of EORTC 22921 and FFCD 9203 trials: Surrogacy in question? *European Journal of Cancer*. 2012;48(12): 1781–1790. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2012.03.016>.
58. Jean-Pierre Gérard , David Azria , Sophie Gourgou-Bourgade , Isabelle Martel-Laffay , Christophe Hennequin , Pierre-Luc Etienne, et al. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodigé 2.

- Journal of clinical oncology*. 2010;28(10): 1638–1644. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.8376>.
59. Shia J, McManus M, Guillem JG., Leibold T., Zhou Qin MA, Tang LH., et al. Significance of acellular mucin pools in rectal carcinoma after neoadjuvant chemoradiotherapy. *The American journal of surgical pathology*. 2011;35(1): 127–134. <https://doi.org/10.1097/PAS.0B013E318200CF78>.
60. Frédéric Bibeau, Anne Rullier, Marie-Françoise Jourdan, Hélène Frugier, Julien Palasse, Cristina Leaha, et al. [Locally advanced rectal cancer management: which role for the pathologist in 2011?]. *Annales de pathologie*. 2011;31(6): 433–441. <https://doi.org/10.1016/J.ANNPAT.2011.10.010>.
61. Monica Marabelli, Sara Gandini, Paola Raviele, Rafaniello Massimo Barberis, Lucio Bertario, Bernardo Bonanni, et al. Is tumor testing efficiency for Lynch syndrome different in rectal and colon cancer? *Digestive and liver disease*. 2020;52(12): 1503–1511. <https://doi.org/10.1016/J.DLD.2020.06.002>.
62. Jörg Trojan, Sebastian Stintzing, Oliver Haase, Christine Koch, Paul Ziegler, Melanie Demes, et al. Complete pathological response after neoadjuvant short-course immunotherapy with ipilimumab and nivolumab in locally advanced MSI-H/dMMR rectal cancer. *The oncologist*. 2021; onco.13955. <https://doi.org/10.1002/ONCO.13955>.
63. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(12): 2091–2096. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.21.9170>.
64. D S. Evolving role of neoadjuvant therapy in rectal cancer. *Current treatment options in oncology*. 2013;14(3): 350–364. <https://doi.org/10.1007/S11864-013-0242-8>.
65. Adjuvant Therapy for Patients With Colon and Rectal Cancer. *JAMA*. 1990;264(11): 1444–1450. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1990.03450110090034>.
66. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(17): 1731–1740. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040694>.
67. Rob Glynne-Jones, Ian Chau. Neoadjuvant therapy before surgical treatment. *European Journal of Cancer*. 2013;11(2): 45–59. <https://doi.org/10.1016/J.EJCSUP.2013.07.032>.
68. Carlos Fernandez-Martos, Gina Brown, Rafael Estevan, Antonieta Salud, Clara Montagut, Joan

- Maurel, et al. Preoperative chemotherapy in patients with intermediate-risk rectal adenocarcinoma selected by high-resolution magnetic resonance imaging: the GEMCAD 0801 Phase II Multicenter Trial. *The oncologist*. 2014;19(10): 1042–1043. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2014-0233>.
69. Deborah Schrag, Martin R. Weiser, Karyn A. Goodman, Mithat Goïnen, Ellen Hollywood, Andrea Cercek, et al. Neoadjuvant chemotherapy without routine use of radiation therapy for patients with locally advanced rectal cancer: a pilot trial. *Journal of clinical oncology*. 2014;32(6): 513–518. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.51.7904>.
70. Marijnen CAM, Velde CJH van de, Putter H, Brink M van den, Maas CP, Martijn H, et al. Impact of Short-Term Preoperative Radiotherapy on Health-Related Quality of Life and Sexual Functioning in Primary Rectal Cancer: Report of a Multicenter Randomized Trial. *Journal of clinical oncology*. 2016;23(9): 1847–1858. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.256>.
71. Trial SRC. Improved Survival with Preoperative Radiotherapy in Resectable Rectal Cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;336(14): 980–987. <https://doi.org/10.1056/NEJM199704033361402>.
72. Joakim Folkesson, Helgi Birgisson, Lars Pahlman, Bjorn Cedermark, Bengt Glimelius, Ulf Gunnarsson. Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(24): 5644–5650. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.08.144>.
73. Ellen Kapiteijn, Corrie A.M. Marijnen, Iris D. Nagtegaal, Hein Putter, Willem H. Steup, Theo Wiggers, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2001;345(9): 638–646. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A010580>.
74. Willem van Gijn, Corrie AM Marijnen, Iris D Nagtegaal, Elma Meershoek-Klein Kranenbarg, Hein Putter, Theo Wiggers, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *The Lancet. Oncology*. 2011;12(6): 575–582. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70097-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70097-3).
75. David Sebag-Montefiore, Richard J Stephens, Robert Steele, John Monson, Robert Grieve, Subhash Khanna, et al. Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *Lancet*. 2009;373(9666): 811–820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60484-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60484-0).
76. K. Bujko, M.P. Nowacki, A. Nasierowska-Guttmejer, W. Michalski, M. Bębenek, M. Pudełko, et

- al. Sphincter preservation following preoperative radiotherapy for rectal cancer: report of a randomised trial comparing short-term radiotherapy vs. conventionally fractionated radiochemotherapy. *Radiotherapy and oncology*. 2004;72(1): 15–24.
<https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2003.12.006>.
77. K Bujko, M P Nowacki, A Nasierowska-Guttmejer, W Michalski, M Bebenek, M Kryj. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *The British journal of surgery*. 2006;93(10): 1215–1223. <https://doi.org/10.1002/BJS.5506>.
78. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, Solomon M, Goldstein D, Joseph D, et al. Randomized Trial of Short-Course Radiotherapy Versus Long-Course Chemoradiation Comparing Rates of Local Recurrence in Patients With T3 Rectal Cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group Trial 01.04. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(31): 3827–3833.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.9597>.
79. Rutten H, den Dulk M, Lemmens V, Nieuwenhuijzen G, Krijnen P, Jansen-Landheer M, et al. Official journal for European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) European Journal of Cancer: Official journal for European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *European Journal of Cancer*. 2007;43(15): 2295–2300.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.07.009>.
80. D Pettersson, B Cedermark, T Holm, C Radu, L Pålman, B Glimelius, et al. Interim analysis of the Stockholm III trial of preoperative radiotherapy regimens for rectal cancer. *The British journal of surgery*. 2010;97(4): 580–587. <https://doi.org/10.1002/BJS.6914>.
81. Johan Erlandsson, Ester Lörinc, Madelene Ahlberg, David Pettersson, Torbjörn Holm, Bengt Glimelius, et al. Tumour regression after radiotherapy for rectal cancer - Results from the randomised Stockholm III trial. *Radiotherapy and oncology*. 2019;135: 178–186.
<https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2019.03.016>.
82. K. Bujko, L. Wyrwicz, A. Rutkowski, M. Malinowska, L. Pietrzak, J. Kryński, et al. Long-course oxaliplatin-based preoperative chemoradiation versus 5 × 5 Gy and consolidation chemotherapy for cT4 or fixed cT3 rectal cancer: results of a randomized phase III study. *Annals of oncology*. 2016;27(5): 834–842. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW062>.
83. Maxime J.M. van der Valk, Corrie A.M. Marijnen, Boudewijn van Etten, Esmée A. Dijkstra, Denise E. Hilling, Elma Meershoek-Klein Kranenbarg, et al. Compliance and tolerability of short-course radiotherapy followed by preoperative chemotherapy and surgery for high-risk rectal cancer

- Results of the international randomized RAPIDO-trial. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2020;147: 75–83.
<https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2020.03.011>.
84. Renu R Bahadoer, Esmée A Dijkstra, Boudewijn van Etten, Corrie A M Marijnen, Hein Putter, Elma Meershoek-Klein Kranenbarg, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. 2021;22(1): 29–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30555-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30555-6).
85. Bernard Fisher, Norman Wolmark, Howard Rockette, Carol Redmond, Melvin Deutsch, D. Lawrence Wickerham, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01. *Journal of the National Cancer Institute*. 1988;80(1): 21–29. <https://doi.org/10.1093/JNCI/80.1.21>.
86. Ralf-Dieter Hofheinz, Frederik Wenz, Stefan Post, Axel Matzdorff, Stephan Laechelt, Jörg T Hartmann, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. 2012;13(6): 579–588. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70116-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70116-X).
87. Jean-Pierre Gérard, Thierry Conroy, Franck Bonnetain, Olivier Bouché, Olivier Chapet, Marie-Thérèse Closon-Dejardin, Michel Untch, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *Journal of clinical oncology*. 2006;24(28): 4620–4625. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.7629>.
88. Jean-François Bosset, Laurence Collette, Gilles Calais, Laurent Mineur, Philippe Maingon, Ljiljana Radošević-Jelić, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355(11): 1114–1123. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA060829>.
89. Prof Jean-François Bosset, Gilles Calais, Laurent Mineur, Philippe Maingon, Suzana Stojanović-Rundić, René-Jean Bensadoun, et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. *The Lancet. Oncology*. 2014;15(2): 184–190. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70599-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70599-0).
90. Laura De Caluwé, Yves Van Nieuwenhove, Wim P Ceelen. Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;2013(2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006041.PUB3>.
91. Nuh N. Rahbari, Heike Elbers, Vasileios Askoxylakis, Edith Motschall, Ulrich Bork, Markus W.

- Büchler, et al. Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(13): 4169–4182. <https://doi.org/10.1245/S10434-013-3198-9>.
92. Rolf Sauer, Heinz Becker, Werner Hohenberger, Claus Rödel, Christian Wittekind, Rainer Fietkau,, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(17): 1731–1740. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA040694>.
93. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(16): 1926–1933. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.1836>.
94. Mark S. Roh, Linda H. Colangelo, Michael J. O'Connell, Greg Yothers, Melvin Deutsch, Carmen J. Allegra, et al. Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(31): 5124–5130. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.0467>.
95. Jean-Pierre Gérard, David Azria, Sophie Gourgou-Bourgade, Isabelle Martel-Lafay, Christophe Hennequin, Pierre-Luc Etienne, et al. Clinical outcome of the ACCORD 12/0405 PRODIGE 2 randomized trial in rectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2012;30(36): 4558–4565. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.8771>.
96. Ramon Salazar, Jaume Capdevila, Berta Laquente, Jose Luis Manzano, Carles Pericay, Mercedes Martínez Villacampa, et al. A randomized phase II study of capecitabine-based chemoradiation with or without bevacizumab in resectable locally advanced rectal cancer: clinical and biological features. *BMC cancer*. 2015;15(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-015-1053-Z>.
97. Fernandez-Martos C, Garcia-Albeniz X, Pericay C, Maurel J, Aparicio J, Montagut C, et al. Chemoradiation, surgery and adjuvant chemotherapy versus induction chemotherapy followed by chemoradiation and surgery: long-term results of the Spanish GCR-3 phase II randomized trial†. *Annals of Oncology*. 2015;26(8): 1722–1728. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV223>.
98. Fernandez-Martos C, Safont M, Feliu J, Pericay C, Gallen M, Vera R, et al. Induction chemotherapy with or without chemoradiation in intermediate-risk rectal cancer patients defined by magnetic resonance imaging (MRI): A GEMCAD study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(15_suppl): TPS196–TPS196. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.15_SUPPL.TPS196.
99. Fernández-Martos C, Pericay C, Losa F, García-Carbonero R, Layos L, Rodríguez-Salas N, et al. Effect of Aflibercept Plus Modified FOLFOX6 Induction Chemotherapy Before Standard

- Chemoradiotherapy and Surgery in Patients With High-Risk Rectal Adenocarcinoma: The GEMCAD 1402 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*. 2019;5(11): 1566–1573.
<https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2019.2294>.
100. Dewdney A, Cunningham D, Tabernero J, Capdevila J, Glimelius B, Cervantes A, et al. Multicenter randomized phase II clinical trial comparing neoadjuvant oxaliplatin, capecitabine, and preoperative radiotherapy with or without cetuximab followed by total mesorectal excision in patients with high-risk rectal cancer (EXPERT-C). *Journal of clinical oncology*. 2012;30(14): 1620–1627.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.6036>.
101. Christophe Borg, Georges Manton, Frank Boudghène, Françoise Mornex, François Ghiringhelli, Antoine Adenis, et al. Efficacy and Safety of Two Neoadjuvant Strategies With Bevacizumab in MRI-Defined Locally Advanced T3 Resectable Rectal Cancer: Final Results of a Randomized, Noncomparative Phase 2 INOVA Study. *Clinical colorectal cancer*. 2019;18(3): 200-208.e1.
<https://doi.org/10.1016/J.CLCC.2019.04.006>.
102. R. Maréchal, B. Vos, M. Polus, T. Delaunoit, M. Peeters, P. Demetter, et al. Short course chemotherapy followed by concomitant chemoradiotherapy and surgery in locally advanced rectal cancer: a randomized multicentric phase II study. *Annals of oncology*. 2012;23(6): 1525–1530.
<https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDR473>.
103. Conroy T, Lamfichekh N, Etienne PL, Rio E, FRANCOIS E, Mesgouez-Nebout N, et al. Total neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer: Final results of PRODIGE 23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(15_suppl): 4007–4007.
https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_SUPPL.4007.
104. Conroy T, Etienne PL, Rio E, Evesque L, Mesgouez-Nebout N, Vendrely V, et al. Total neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer: 7-year results of PRODIGE 23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(17_suppl): LBA3504–LBA3504.
https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.17_SUPPL.LBA3504.
105. Maxime J.M. van der Valk, Corrie A.M. Marijnen, Boudewijn van Etten, Esmée A. Dijkstra Denise E. Hilling, Elma Meershoek-Klein Kranenbarg, et al. Compliance and tolerability of short-course radiotherapy followed by preoperative chemotherapy and surgery for high-risk rectal cancer - Results of the international randomized RAPIDO-trial. *Radiotherapy and oncology*. 2020;147: 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2020.03.011>.

106. Fokas E, Allgäuer M, Polat B, Klautke G, Grabenbauer GG, Fietkau R, et al. Randomized Phase II Trial of Chemoradiotherapy Plus Induction or Consolidation Chemotherapy as Total Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Rectal Cancer: CAO/ARO/AIO-12. *https://doi.org/10.1200/JCO.19.00308*. 2019;37(34): 3212–3222. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00308>.
107. Sclafani F, Brown G, Cunningham D, Wotherspoon A, Tait D, Peckitt C, et al. PAN-EX: a pooled analysis of two trials of neoadjuvant chemotherapy followed by chemoradiotherapy in MRI-defined, locally advanced rectal cancer. *Annals of Oncology*. 2016;27(8): 1557–1565. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW215>.
108. Cercek A, Roxburgh CSD, Strombom P, Smith JJ, Temple LKF, Nash GM, et al. Adoption of Total Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *JAMA Oncology*. 2018;4(6): e180071–e180071. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2018.0071>.
109. Schrag D, Shi Q, Weiser MR, Gollub MJ, Saltz LB, Musher BL, et al. Preoperative Treatment of Locally Advanced Rectal Cancer. *The New England journal of medicine*. 2023; https://doi.org/10.1056/NEJMOA2303269/SUPPL_FILE/NEJMOA2303269_DATA-SHARING.PDF.
110. Zaborowski A, Stakelum A, Winter DC. Systematic review of outcomes after total neoadjuvant therapy for locally advanced rectal cancer. *British Journal of Surgery*. 2019;106(8): 979–987. <https://doi.org/10.1002/BJS.11171>.
111. Ciseł B, Pietrzak L, Michalski W, Wyrwicz L, Rutkowski A, Kosakowska E, et al. Long-course preoperative chemoradiation versus 5 × 5 Gy and consolidation chemotherapy for clinical T4 and fixed clinical T3 rectal cancer: long-term results of the randomized Polish II study. *Annals of Oncology*. 2019;30(8): 1298–1303. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDZ186>.
112. Julio Garcia-Aguilar, Oliver S Chow, David D Smith, Jorge E Marcet, Peter A Cataldo, Madhulika G Varma, et al. Effect of adding mFOLFOX6 after neoadjuvant chemoradiation in locally advanced rectal cancer: a multicentre, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*. 2015;16(8): 957–966. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00004-2).
113. Pucciarelli S, Toppan P, Friso ML, Russo V, Pasetto L, Urso E, et al. Complete pathologic response following preoperative chemoradiation therapy for middle to lower rectal cancer is not a prognostic factor for a better outcome. *Diseases of the colon and rectum*. 2004;47(11): 1798–1807. <https://doi.org/10.1007/S10350-004-0681-1>.
114. Claus Rödel, Peter Martus, Thomas Papadopoulos, Laszlo Füzesi, Martin Klimpfnger, Rainer

- Fietkau, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(34): 8688–8696.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.1329>.
115. Vecchio FM, Valentini V, Minsky BD, Padula GDA, Venkatraman ES, Balducci M, et al. The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2005;62(3): 752–760.
<https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2004.11.017>.
116. Vincenzo Valentini, Claudio Coco, Aurelio Picciocchi, Gian Battista Doglietto, Fabrizio Ambesi-Impiombato, Maurizio Cosimelli, et al. Does downstaging predict improved outcome after preoperative chemoradiation for extraperitoneal locally advanced rectal cancer? A long-term analysis of 165 patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2002;53(3): 664–674. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(02\)02764-5](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(02)02764-5).
117. Shang-Jui Wang, Lara Hathout, Usha Malhotra, Nell Maloney-Patel, Sarah Kilic, Elizabeth Poplin, et al. Decision-Making Strategy for Rectal Cancer Management Using Radiation Therapy for Elderly or Comorbid Patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2018;100(4): 926–944. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2017.12.261>.
118. Vernet R, Borrás JM, Aliste L, Antonio M, Guarga A, Manchón-Walsh P. Influence of age on variation in patterns of care in patients with rectal cancer in Catalonia (Spain). *Clinical and Translational Oncology* 2018 20:12. 2018;20(12): 1538–1547. <https://doi.org/10.1007/S12094-018-1882-8>.
119. Silvia Rossi, Paolo Baili, Riccardo Capocaccia, Massimiliano Caldora, Eugenio Carrani, Pamela Minicozzi, et al. The EURO-CARE-5 study on cancer survival in Europe 1999-2007: Database, quality checks and statistical analysis methods. *European journal of cancer*. 2015;51(15): 2104–2119. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2015.08.001>.
120. Thomas Aparicio, Atika Navazesh, Isabelle Boutron, Nadia Bouarioua, Denis Chosidow, Mathieu Mion, et al. Half of elderly patients routinely treated for colorectal cancer receive a sub-standard treatment. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2009;71(3): 249–257.
<https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2008.11.006>.
121. Cai X, Wu H, Peng J, Zhu J, Cai S, Cai G, et al. Tolerability and outcomes of radiotherapy or chemoradiotherapy for rectal cancer in elderly patients aged 70 years and older. *Radiation Oncology* 2013 8:1. 2013;8(1): 1–6. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-86>.
122. Danielle N. Margalit, M.P.H. Harvey J. Mamon, Marek Ancukiewicz, Jeffrey Clark, Christopher G.

- Willett, Theodore S. Hong, et al. Tolerability of combined modality therapy for rectal cancer in elderly patients aged 75 years and older. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;81(5). <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2010.12.056>.
123. David Tougeron, Bernard Roullet, Bernard Paillot, Hadji Hamidou, Jean-Marc Tourani, René-Jean Bensadoun, et al. Safety and outcome of chemoradiotherapy in elderly patients with rectal cancer: results from two French tertiary centres. *Digestive and liver disease*. 2012;44(4): 350–354. <https://doi.org/10.1016/J.DLD.2011.10.017>.
124. Jue-feng Wan¹, Ji Zhu¹, Gui-chao Li¹, Wen-jie Sun¹ and Zhen Zhang. Implications for determining the optimal treatment for locally advanced rectal cancer in elderly patients aged 75 years and older. *Oncotarget*. 2015;6(30): 30377–30383. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4599>.
125. D.M. Jiang, S. Raissouni, J. Mercer, A. Kumar, R. Goodwin, D.Y. Heng, et al. Clinical outcomes of elderly patients receiving neoadjuvant chemoradiation for locally advanced rectal cancer. *Annals of oncology*. 2015;26(10): 2102–2106. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV331>.
126. Sung Soo-Y; Jang Hong S. Kim, Sung H., Jeong Jae U., Jeong Songmi, Song Jin H., et al. Oncologic Outcome and Morbidity in the Elderly Rectal Cancer Patients After Preoperative Chemoradiotherapy and Total Mesorectal Excision: A Multi-institutional and Case-matched Control Study. *Annals of surgery*. 2019;269(1): 108–113. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002443>.
127. Bin Ma, Peng Gao, Hongchi Wang, Qingzhou Xu, Yongxi Song, Xuanzhang Huang, et al. What has preoperative radio(chemo)therapy brought to localized rectal cancer patients in terms of perioperative and long-term outcomes over the past decades? A systematic review and meta-analysis based on 41,121 patients. *International journal of cancer*. 2017;141(5): 1052–1065. <https://doi.org/10.1002/IJC.30805>.
128. Ruzzo A, Graziano F, Galli F, Galli F, Rulli E, Lonardi S, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients. *British Journal of Cancer*. 2017;117(9): 1269. <https://doi.org/10.1038/BJC.2017.289>.
129. Deenen MJ, Meulendijks D. Recommendation on testing for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in the ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2017;28(1): 184. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW533>.

130. Lorient MA, Ciccolini J, Thomas F, Barin-Le-Guellec C, Royer B, Milano G, et al. Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) et sécurisation des chimiothérapies à base de fluoropyrimidines : mise au point et recommandations nationales du GPCO-Unicancer et du RNPx. *Bulletin du Cancer*. 2018;105(4): 397–407.
<https://doi.org/10.1016/J.BULCAN.2018.02.001>.
131. Richard J. Stephens, Lindsay C. Thompson, Phil Quirke, Robert Steele, Robert Grieve, Jean Couture, Gareth O. Griffiths, et al. Impact of short-course preoperative radiotherapy for rectal cancer on patients' quality of life: data from the Medical Research Council CR07/National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group C016 randomized clinical trial. *Journal of clinical oncology*. 2010;28(27): 4233–4239. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.5264>.
132. Marsh PJ, James RD, Schofield PF. Adjuvant preoperative radiotherapy for locally advanced rectal carcinoma. Results of a prospective, randomized trial. *Diseases of the colon and rectum*. 1994;37(12): 1205–1214. <https://doi.org/10.1007/BF02257783>.
133. Jasper Nijkamp, Miranda Kusters, Regina G.H. Beets-Tan, Geerard L. Beets, Cornelis J.H. van de Velde, Corrie A.M. Marijnen, et al. Three-dimensional analysis of recurrence patterns in rectal cancer: the cranial border in hypofractionated preoperative radiotherapy can be lowered. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;80(1): 103–110.
<https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2010.01.046>.
134. Ines Joye, Karin Haustermans. Clinical target volume delineation for rectal cancer radiation therapy: time for updated guidelines? *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2015;91(4): 690–691. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2014.11.006>.
135. Azria D, Doyen J, Jarlier M, Martel-Lafay I, Hennequin C, Etienne P, et al. Late toxicities and clinical outcome at 5 years of the ACCORD 12/0405-PRODIGE 02 trial comparing two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for intermediate-risk rectal cancer. *Annals of Oncology*. 2017;28(10): 2436–2442. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDX351>.
136. Cécile Ortholan, Pascale Romestaing, Olivier Chapet, Jean Pierre Gerard. Correlation in rectal cancer between clinical tumor response after neoadjuvant radiotherapy and sphincter or organ preservation: 10-year results of the Lyon R 96-02 randomized trial. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;83(2). <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2011.12.002>.
137. Anne Claire Frin, Ludovic Evesque, Jocelyn Gal, Karène Benezery, Eric François, Jean Gugenheim, et al. Organ or sphincter preservation for rectal cancer. The role of contact X-ray brachytherapy in a monocentric series of 112 patients. *European journal of cancer*. 2017;72: 124–

136. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2016.11.007>.
138. Myint AS, Thamphya B, Gerard JP. Does non-TME surgery of rectal cancer compromise the chance of cure? Preliminary surgical salvage data from OPERA phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(3_suppl): 12–12. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.3_SUPPL.12.
139. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus Postoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(17): 1731–1740. <https://doi.org/10.1056/nejmoa040694>.
140. Sune Høirup Petersen, Henrik Harling, Lene Tschemerinsky Kirkeby, Peer Wille-Jørgensen, Simone Mocellin. Postoperative adjuvant chemotherapy in rectal cancer operated for cure. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;2012(3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004078.PUB2>.
141. QUASAR Collaborative Group. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007;370(9604): 2020–2029. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61866-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61866-2).
142. Breugom AJ, Swets M, Bosset JF, Collette L, Sainato A, Cionini L, et al. Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology*. 2015;16(2): 200–207. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71199-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71199-4).
143. Hofheinz RD, Rödel C, Burkholder I, Kienle P. Adjuvant chemotherapy for rectal cancer. *The Lancet Oncology*. 2015;16(4): e154–e155. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70112-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70112-9).
144. You K yun, Bi Z fei, Liu Y min, Qiu X sheng. Adjuvant chemotherapy for rectal cancer. *The Lancet Oncology*. 2015;16(4): e152. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70048-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70048-3).
145. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2009;350(23): 2343–2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA032709>.
146. J. Philip Kuebler, H. Samuel Wieand, Michael J. O'Connell, Roy E. Smith, Linda H. Colangelo, Greg Yothers, 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. *Journal of clinical oncology*. 2007;25(16): 2198–2204. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.2974>.
147. Rödel C, Graeven U, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Arnold D, et al. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally

- advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(8): 979–989.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00159-X).
148. Hans-Joachim Schmoll, Alexander Stein, Eric Van Cutsem, Timothy Price, Ralf D. Hofheinz, Bernard Nordlinger, et al. Pre- and Postoperative Capecitabine Without or With Oxaliplatin in Locally Advanced Rectal Cancer: PETACC 6 Trial by EORTC GITCG and ROG, AIO, AGITG, BGDO, and FFCD. *Journal of clinical oncology*. 2021;39(1): 17–29.
<https://doi.org/10.1200/JCO.20.01740>.
149. Yong Sang Hong, Sun Young Kim, Ji Sung Lee, Byung-Ho Nam, Kyu-pyo Kim, Jeong Eun Kim, et al. Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy for Rectal Cancer After Preoperative Chemoradiotherapy (ADORE): Long-Term Results of a Randomized Controlled Trial. *Journal of clinical oncology*. 2019;37(33): 3111–3123. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00016>.
150. Yanhong Deng, Pan Chi, Ping Lan, MD, Lei Wang, Weiqing Chen, Long Cui, et al. Neoadjuvant Modified FOLFOX6 With or Without Radiation Versus Fluorouracil Plus Radiation for Locally Advanced Rectal Cancer: Final Results of the Chinese FOWARC Trial. *Journal of clinical oncology*. 2019;37(34): 3223–3233. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.02309>.
151. Monique Maas, Patty J Nelemans, Vincenzo Valentini, Christopher H. Crane, Carlo Capirci, Claus Rödel, et al. Adjuvant chemotherapy in rectal cancer: defining subgroups who may benefit after neoadjuvant chemoradiation and resection: a pooled analysis of 3,313 patients. *International journal of cancer*. 2015;137(1): 212–220. <https://doi.org/10.1002/IJC.29355>.
152. Polanco PM, Mokdad AA, Zhu H, Choti MA, Huerta S. Association of Adjuvant Chemotherapy With Overall Survival in Patients With Rectal Cancer and Pathologic Complete Response Following Neoadjuvant Chemotherapy and Resection. *JAMA Oncology*. 2018;4(7): 938–943.
<https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2018.0231>.
153. Papaccio F, Roselló S, Huerta M, Gambardella V, Tarazona N, Fleitas T, et al. Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Cancers 2020, Vol. 12, Page 3611*. 2020;12(12): 3611. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12123611>.
154. A Habr-Gama, R O Perez. Non-operative management of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation. *The British journal of surgery*. 2009;96(2): 125–127.
<https://doi.org/10.1002/BJS.6470>.
155. Angelita Habr-Gama, Joaquim Gama-Rodrigues, Guilherme P. São Julião, Charles Sabbagh, Patricio B. Lynn, Rodrigo O. Perez,, et al. Local recurrence after complete clinical response and

- watch and wait in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: impact of salvage therapy on local disease control. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2014;88(4): 822–828. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2013.12.012>.
156. E Lezoche, M Baldarelli, G Lezoche, A M Paganini, R Gesuita, M Guerrieri. Randomized clinical trial of endoluminal locoregional resection versus laparoscopic total mesorectal excision for T2 rectal cancer after neoadjuvant therapy. *The British journal of surgery*. 2012;99(9): 1211–1218. <https://doi.org/10.1002/BJS.8821>.
157. Eric Rullier, Philippe Rouanet, Jean-Jacques Tuech, Alain Valverde, Bernard Lelong, Michel Rivoire, et al. Organ preservation for rectal cancer (GRECCAR 2): a prospective, randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;390(10093): 469–479. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31056-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31056-5).
158. Nougaret S, Fujii S, Addley HC, Bibeau F, Pandey H, Mikhael H, et al. Neoadjuvant chemotherapy evaluation by MRI volumetry in rectal cancer followed by chemoradiation and total mesorectal excision: Initial experience. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2013;38(3): 726–732. <https://doi.org/10.1002/JMRI.23905>.
159. Nougaret S, Reinhold C, Mikhael HW, Rouanet P, Bibeau F, Brown G. The use of MR imaging in treatment planning for patients with rectal carcinoma: Have you checked the ‘distance’. *Radiology*. 2013;268(2): 330–334. <https://doi.org/10.1148/RADIOL.13121361>.
160. Patel UB, Taylor F, Blomqvist L, George C, Evans H, Tekkis P, et al. Magnetic resonance imaging-detected tumor response for locally advanced rectal cancer predicts survival outcomes: MERCURY experience. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(28): 3753–3760. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.9068>.
161. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Annals of surgery*. 1995;221(1): 29–42. <https://doi.org/10.1097/00000658-199501000-00004>.
162. R.J Heald, R.D.H Ryall. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*. 1986;1(8496): 1479–1482. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91510-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91510-2).
163. Antonio I. Picon, Harvey G. Moore, Stephen S. Sternberg, Bruce D. Minsky, Philip B. Paty, David Blumberg, et al. Prognostic significance of depth of gross or microscopic perirectal fat invasion in T3 N0 M0 rectal cancers following sharp mesorectal excision and no adjuvant therapy. *International journal of colorectal disease*. 2003;18(6): 487–492. <https://doi.org/10.1007/S00384-003-0504-1>.

164. L. Pahlman, K. Bujko, A. Rutkowski, W. Michalski. Altering the therapeutic paradigm towards a distal bowel margin of. *Colorectal disease*. 2013;15(4). <https://doi.org/10.1111/CODI.12120>.
165. Yafan Yang, Guiying Wang, Jingli He, Jianfeng Zhang, Jinchuan Xi, Feifei Wang. High tie versus low tie of the inferior mesenteric artery in colorectal cancer: A meta-analysis. *International journal of surgery*. 2018;52: 20–24. <https://doi.org/10.1016/J.IJSU.2017.12.030>.
166. Wang Y, Zhou M, Yang L, Zhang J, Deng W, Shen L, et al. Prognostic value of lymph node yield in locally advanced rectal cancer with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15_suppl): e15680–e15680. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_SUPPL.E15680.
167. Fleshman J, Branda M, Sargent DJ, Boller AM, George V, Abbas M, et al. Effect of Laparoscopic-Assisted Resection vs Open Resection of Stage II or III Rectal Cancer on Pathologic Outcomes: The ACOSOG Z6051 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015;314(13): 1346. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2015.10529>.
168. Fazio VW, Zutshi M, Remzi FH, Parc Y, Ruppert R, Fürst A, et al. A Randomized Multicenter Trial to Compare Long-Term Functional Outcome, Quality of Life, and Complications of Surgical Procedures for Low Rectal Cancers. *Annals of Surgery*. 2007;246(3): 481. <https://doi.org/10.1097/SLA.0B013E3181485617>.
169. Rullier Eric, Denost Quentin, Vendrely Véronique, Rullier Anne, Laurent Christophe, Ph.D.1., Low rectal cancer: classification and standardization of surgery. *Diseases of the colon and rectum*. 2013;56(5): 560–567. <https://doi.org/10.1097/DCR.0B013E31827C4A8C>.
170. P H Chapuis, O F Dent, R Fisher, R C Newland, M T Pheils, E Smyth, et al. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *The British journal of surgery*. 1985;72(9): 698–702. <https://doi.org/10.1002/BJS.1800720909>.
171. Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation. *Gastroenterology*. 1997;112(4): 1096–1102. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70119-7](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70119-7).
172. Wiggers T, Arends JW, Volovics A. Regression analysis of prognostic factors in colorectal cancer after curative resections. *Diseases of the colon and rectum*. 1988;31(1): 33–41. <https://doi.org/10.1007/BF02552567>.
173. Panarelli NC., Schreiner AM., Brandt SM., Shepherd NA., Yantiss RK.. Histologic features and cytologic techniques that aid pathologic stage assessment of colonic adenocarcinoma. *The American*

journal of surgical pathology. 2013;37(8): 1252–1258.

<https://doi.org/10.1097/PAS.0B013E3182960E7C>.

174. Stephen B.E, Carolyn C.C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6): 1471–1474. <https://doi.org/10.1245/S10434-010-0985-4>.
175. Mary Kay Washington, Jordan Berlin, Philip A. Branton, Lawrence J. Burgart, David K. Carter, Patrick L. Fitzgibbons, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinomas of the colon and rectum. *Archives of pathology and laboratory medicine*. 2008;132(7): 1539–1551. <https://doi.org/10.5858/2008-132-1182-PFTEOS>.
176. Yutaka Takahashi, Susan L. Tucker, Yasuhiko Kitadai, Aaryan N. Koura, Corazon D. Bucana, Karen R. Cleary, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Archives of surgery*. 1997;132(5): 541–546. <https://doi.org/10.1001/ARCHSURG.1997.01430290087018>.
177. Glasgow SC, Bleier JIS, Burgart LJ, Finne CO, Lowry AC. Meta-analysis of histopathological features of primary colorectal cancers that predict lymph node metastases. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2012;16(5): 1019–1028. <https://doi.org/10.1007/S11605-012-1827-4>.
178. F M, JJ A, T B, R G, R C, GE B. Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma. *Annals of surgery*. 1991;214(1): 11–18. <https://doi.org/10.1097/00000658-199107000-00003>.
179. Kornprat Peter, Pollheimer M J., Lindtner, RA., Schlemmer A, R P, Langner C. Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer: a critical reappraisal. *American journal of clinical oncology*. 2011;34(1): 43–49. <https://doi.org/10.1097/COC.0B013E3181CAE8DD>.
180. Christian Wittekind, Carolyn C. Compton M, Frederick L. Greene, Leslie H. Sobin. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*. 2002;94(9): 2511–2516. <https://doi.org/10.1002/CNCR.10492>.
181. C G Willett, S Goldberg, P C Shellito, M Grossbard, J Clark, C Fung, G Proulx, M Daly DSK. Does postoperative irradiation play a role in the adjuvant therapy of stage T4 colon cancer? *Cancer Journal from Scientific American* 1999;5(4):242-7.
182. Christian Wittekind, Carolyn Compton, Phil Quirke, Iris Nagtegaal, Susanne Merkel, Paul Hermanek, et al. A uniform residual tumor (R) classification: integration of the R classification and the circumferential margin status. *Cancer*. 2009;115(15): 3483–3488.

<https://doi.org/10.1002/CNCR.24320>.

183. Iris D. Nagtegaal , Phil Quirke. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *Journal of clinical oncology*. 2008;26(2): 303–312.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.7027>.
184. I.J Adam, I.G Martin, Pj Finan, D Johnston, M.O Mohamdee, N Scoott, et al. Role of circumferential margin involvement in the local recurrence of rectal cancer. *Lancet*. 1994;344(8924): 707–711. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92206-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92206-3).
185. P. Quirke M.F. Dixon P. Durdey N.S. Williams. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet*. 1986;2(8514): 996–999. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)92612-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)92612-7).
186. D F M de Haas-Kock, C G M I Baeten, J J Jager, J A Langendijk, L J Schouten, A Volovics, et al. Prognostic significance of radial margins of clearance in rectal cancer. *The British journal of surgery*. 1996;83(6): 781–785. <https://doi.org/10.1002/BJS.1800830617>.
187. Luca Stocchi , Heidi Nelson , Daniel J. Sargent , Michael J. O’Connell , Joel E. Tepper , James E. Krook, et al. Impact of surgical and pathologic variables in rectal cancer: a United States community and cooperative group report. *Journal of clinical oncology*. 2001;19(18): 3895–3902.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.18.3895>.
188. Gosens MJEM, Klaassen RA, Tan-Go I, Rutten HJT, Martijn H, Brule AJC van den, et al. Circumferential Margin Involvement Is the Crucial Prognostic Factor after Multimodality Treatment in Patients with Locally Advanced Rectal Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(22): 6617–6623. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1197>.
189. Jeremy R Parfitt, David K Driman. The total mesorectal excision specimen for rectal cancer: a review of its pathological assessment. *Journal of clinical pathology*. 2007;60(8): 849–855.
<https://doi.org/10.1136/JCP.2006.043802>.
190. T E Bernstein, B H Endreth, P Romundstad, A Wibe. Circumferential resection margin as a prognostic factor in rectal cancer. *The British journal of surgery*. 2009;96(11): 1348–1357.
<https://doi.org/10.1002/BJS.6739>.
191. Kazuhiro Yasuda, Yosuke Adachi, Norio Shiraishi, Kimio Yamaguchi, Yasuhiro Hirabayashi, Seigo Kitano. Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 2001;8(4): 300–304. <https://doi.org/10.1007/S10434-001-0300-5>.

192. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2017;28: iv22–iv40. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx224>.
193. SD M. Cancer bypasses the lymph nodes. *Science*. 2017;357(6346): 35–36. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN8299>.
194. Naxerova K, Reiter JG, Brachtel E, Lennerz JK, Van de Weterin M, rowan A, et al. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science*. 2017;357(6346). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAI8515>.
195. Wolmark N, Fisher B, Wieand HS. The prognostic value of the modifications of the Dukes' C class of colorectal cancer. An analysis of the NSABP clinical trials. *Annals of surgery*. 1986;203(2): 115–122. <https://doi.org/10.1097/00000658-198602000-00001>.
196. Richard S. Swanson, Carolyn C. Compton, Andrew K. Stewart MA, Kirby I. Bland. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Annals of surgical oncology*. 2003;10(1): 65–71. <https://doi.org/10.1245/ASO.2003.03.058>.
197. SL C, AJ B. More extensive nodal dissection improves survival for stages I to III of colon cancer: a population-based study. *Annals of surgery*. 2006;244(4): 602–608. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000237655.11717.50>.
198. Joel E. Tepper, Michael J. O'Connell, Donna Niedzwiecki, Donna Hollis, Carolyn Compton, Al B. Benson, et al. Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2001;19(1): 157–163. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.1.157>.
199. CC C. Optimal pathologic staging: defining stage II disease. *Clinical cancer research*. 2007;13(22 Pt 2). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1398>.
200. George J. Chang, Miguel A. Rodriguez-Bigas, John M. Skibber, Virginia A. Moyer. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(6): 433–441. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJK092>.
201. W. Ceelen MD, Y. Van Nieuwenhove, P. Pattyn. Prognostic value of the lymph node ratio in stage III colorectal cancer: a systematic review. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(11): 2847–2855. <https://doi.org/10.1245/S10434-010-1158-1>.
202. Adam C. Berger, Elin R. Sigurdson, Thomas LeVoyer, Alexandra Hanlon, Robert J. Mayer, John S. Macdonald, et al. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(34): 8706–8712.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.8852>.

203. Anand Govindarajan , Mithat Gönen , Martin R. Weiser , Jinru Shia , Larissa K. Temple , Jose G. Guillem, et al. Challenging the feasibility and clinical significance of current guidelines on lymph node examination in rectal cancer in the era of neoadjuvant therapy. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(34): 4568–4573. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.2235>.
204. Nuh N. Rahbari , Ulrich Bork , Edith Motschall , Kristian Thorlund , Markus W. Büchler , Moritz Koch, et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology*. 2012;30(1): 60–70. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.9504>.
205. Amy C. Lord Nigel D'Souza Philip H. Pucher Brendan J. Moran A. Muti Abulafi Andrew Wotherspoon, et al. Significance of extranodal tumour deposits in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer*. 2017;82: 92–102. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2017.05.027>.
206. Jean-François Delattre, Romain Cohen, Julie Henriques, Antoine Falcoz, Jean-François Emile, Serge Fratte, et al. Prognostic Value of Tumor Deposits for Disease-Free Survival in Patients With Stage III Colon Cancer: A Post Hoc Analysis of the IDEA France Phase III Trial (PRODIGE-GERCOR). *Journal of clinical oncology*. 2020;38(15): 1702–1710. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01960>.
207. Dorothy S. Lo, Aaron Pollett, Lillian L. Siu, Steve Gallinger, Ronald L. Burkes. Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer*. 2008;112(1): 50–54. <https://doi.org/10.1002/CNCR.23136>.
208. E. J. Th. Belt, M. F. M. van Stijn, H. Bril, E. S. M. de Lange-de Klerk, G. A. Meijer, S. Meijer et al. Lymph node negative colorectal cancers with isolated tumor deposits should be classified and treated as stage III. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(12): 3203–3211. <https://doi.org/10.1245/S10434-010-1152-7>.
209. Ruo, Leyo; Tickoo, Satish; Klimstra, David S.; Minsky, Bruce D.; Saltz, Leonard; Mazumdar, Madhu, et al. Long-term prognostic significance of extent of rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy. *Annals of surgery*. 2002;236(1): 75–81. <https://doi.org/10.1097/00000658-200207000-00012>.
210. Gavioli M, Luppi G, Losi L, Bertolini F, Santantonio M, Falchi AM, et al. Incidence and clinical impact of sterilized disease and minimal residual disease after preoperative radiochemotherapy for

- rectal cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 2005;48(10): 1851–1857.
<https://doi.org/10.1007/S10350-005-0133-6>.
211. R Ryan, D Gibbons, J M P Hyland, D Treanor, A White, H E Mulcahy, et al. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology*. 2005;47(2): 141–146. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2559.2005.02176.X>.
212. Johannes Betge, Marion J. Pollheimer, Richard A. Lindtner, Peter Kornprat, Andrea Schlemmer, Peter Rehak, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012;118(3): 628–638.
<https://doi.org/10.1002/CNCR.26310>.
213. Hogan J, Chang KH, Duff G, Samaha G, Kelly N, Burton M, et al. Lymphovascular invasion: a comprehensive appraisal in colon and rectal adenocarcinoma. *Diseases of the colon and rectum*. 2015;58(6): 547–555. <https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000000361>.
214. Quah H-M, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG., et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Diseases of the colon and rectum*. 2008;51(5): 503–507. <https://doi.org/10.1007/S10350-008-9246-Z>.
215. Al B. Benson, Deborah Schrag , Mark R. Somerfield , Alfred M. Cohen , Alvaro T. Figueredo , Patrick J. Flynn, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology*. 2004;22(16): 3408–3419.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.063>.
216. G. Argilés, J. Tabernero, R. Labianca, D. Hochhauser, R. Salazar, T. Iveson, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2020;31(10): 1291–1305. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.06.022>.
217. Catherine Liebig , Gustavo Ayala , Jonathan Wilks , Gordana Verstovsek , Hao Liu , Neeti Agarwal, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(31): 5131–5137. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4949>.
218. Junjie Peng, Weiqi Sheng, Dan Huang, Alan P. Venook, Ye Xu, Zuqing Guan, et al. Perineural invasion in pT3N0 rectal cancer: the incidence and its prognostic effect. *Cancer*. 2011;117(7): 1415–1421. <https://doi.org/10.1002/CNCR.25620>.
219. Jung Wook Huh, Hyeong Rok Kim, Young Jin Kim MD. Prognostic value of perineural invasion in patients with stage II colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(8): 2066–2072.
<https://doi.org/10.1245/S10434-010-0982-7>.

220. P H Chapuis, O F Dent, R Fisher, R C Newland, M T Pheils, E Smyth, Kim Colquhoun, et al. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *The British journal of surgery*. 1985;72(9): 698–702.
<https://doi.org/10.1002/BJS.1800720909>.
221. T B Halvorsen, E Seim. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(2): 162–166.
<https://doi.org/10.1136/JCP.42.2.162>.
222. Teppei Morikawa, Aya Kuchiba, Zhi Rong Qian, Mari Mino-Kenudson, Jason L. Hornick, Mai Yamauchi, et al. Prognostic significance and molecular associations of tumor growth pattern in colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 2012;19(6): 1944–1953.
<https://doi.org/10.1245/S10434-011-2174-5>.
223. K Canna, P A McArdle, D C McMillan, A-M McNicol, G W Smith, R F McKee, et al. The relationship between tumour T-lymphocyte infiltration, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2005;92(4): 651–654. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6602419>.
224. Laura S. Rozek, Stephanie L. Schmit, Joel K. Greenon, Lynn P. Tomsho, Hedy S. Rennert, Gad Rennert, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Crohn’s-Like Lymphoid Reaction, and Survival From Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(8).
<https://doi.org/10.1093/JNCI/DJW027>.
225. Yue Liu, Jinghong Xu, Yurong Jiao, Yeting Hu, Chenghao Yi, Qiong Li, et al. Neuroendocrine differentiation is a prognostic factor for stage II poorly differentiated colorectal cancer. *BioMed research international*. 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/789575>.
226. Fausto Petrelli Gianluca Tomasello, Karen Borgonovo, Michele Ghidini, Luca Turati, Pierpaolo Dallera, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA oncology*. 2017;3(2): 211–219.
<https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2016.4227>.
227. Tsuyoshi Konishi, Yoshifumi Shimada, Meier Hsu, Lauren Tufts, Rosa Jimenez-Rodriguez, Andrea Cercek, et al. Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. *JAMA oncology*. 2018;4(3): 309–315.
<https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2017.4420>.
228. In Ja Park, Gyu-Seog Choi, Kyoung Hoon Lim, Byung Mo Kang, Soo Han Jun. Serum carcinoembryonic antigen monitoring after curative resection for colorectal cancer: clinical

- significance of the preoperative level. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(11): 3087–3093.
<https://doi.org/10.1245/S10434-009-0625-Z>.
229. Pragatheeshwar Thirunavukarasu, Chetasi Talati, Sumeet Munjal, Kris Attwood, Stephen B. Edge, Valerie Francescutti. Effect of Incorporation of Pretreatment Serum Carcinoembryonic Antigen Levels Into AJCC Staging for Colon Cancer on 5-Year Survival. *JAMA surgery*. 2015;150(8): 747–755. <https://doi.org/10.1001/JAMASURG.2015.0871>.
230. Pragatheeshwar Thirunavukarasu, Shyamsunder Sukumar, Magesh Sathaiah, Meredith Mahan, Kothai Divya Pragatheeshwar, James F. Pingpank, et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(8): 689–697. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJR078>.
231. Kwang Dae Hong, Jun Won Um, Woong-bae Ji, Sung Yup Jung, Sanghee Kang, Sun Il Lee, et al. Endoscopic obstruction in rectal cancers: survival and recurrence patterns following curative surgery. *Journal of laparoendoscopic and advanced surgical techniques. Part A*. 2015;25(4): 278–284. <https://doi.org/10.1089/LAP.2014.0566>.
232. Mohd Azri Mohd Suan, Wei Leong Tan, Shahrul Aiman Soelar, Ibtisam Ismail, Muhammad Radzi Abu Hassan. Intestinal obstruction: predictor of poor prognosis in colorectal carcinoma? *Epidemiology and health*. 2015;37: e2015017. <https://doi.org/10.4178/EPIH/E2015017>.
233. Yik-Hong Ho, Simon K. K. Siu, Petra Buttner, Andrew Stevenson, John Lumley & Russel Stitz. The effect of obstruction and perforation on colorectal cancer disease-free survival. *World journal of surgery*. 2010;34(5): 1091–1101. <https://doi.org/10.1007/S00268-010-0443-2>.
234. Chen HS, Sheen-Chen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: An analysis of prognosis and current trends. *Surgery*. 2000;127(4): 370–376.
<https://doi.org/10.1067/MSY.2000.104674>.
235. Sam Ghazi, Elisabeth Berg, Annika Lindblom, Ulrik Lindfors, Low-Risk Colorectal Cancer Study Group. Clinicopathological analysis of colorectal cancer: a comparison between emergency and elective surgical cases. *World journal of surgical oncology*. 2013;11. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-133>.
236. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA approval summary: Pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(13): 3753–3758. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4070>.
237. Aziz Zaan, Qian Shi, Julien Taieb, Steven R. Alberts, Jeffrey P. Meyers, Thomas C. Smyrk, et al.

- Role of Deficient DNA Mismatch Repair Status in Patients With Stage III Colon Cancer Treated With FOLFOX Adjuvant Chemotherapy: A Pooled Analysis From 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA oncology*. 2018;4(3): 379–383. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2017.2899>.
238. Andrea Cercek, Maria Iñez Braghiroli, Joanne F. Chou, Jaclyn F. Hechtman, Nancy Kemeny, Leonard Saltz, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clinical cancer research*. 2017;23(16): 4753–4760. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0400>.
239. H J N Andreyev, A R Norman, D Cunningham, J Oates, B R Dix, B J Iacopetta, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the ‘RASCAL II’ study. *British journal of cancer*. 2001;85(5): 692–696. <https://doi.org/10.1054/BJOC.2001.1964>.
240. Brulé SY, Jonker DJ, Karapetis CS, O ’callaghan CJ, Moore MJ, Wong R, et al. Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. *European Journal of Cancer*. 2015;51: 1405–1414. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.03.015>.
241. Darryl Shibata, Miguel Angel Peinado, Yuriy Ionov, Sergei Malkhosyan, Manuel Perucho. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nature genetics*. 1994;6(3): 273–281. <https://doi.org/10.1038/NG0394-273>.
242. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (New York, N.Y.)*. 1993;260(5109): 816–819. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8484122>.
243. Guo-Chen Liu, Ran-Yi Liu, Jun-Ping Yan, Xin An, Wu Jiang, Yi-Hong Ling, et al. The Heterogeneity Between Lynch-Associated and Sporadic MMR Deficiency in Colorectal Cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2018;110(9): 975–984. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJY004>.
244. Judith S. Sebolt-Leopold, David T. Dudley, Roman Herrera, Keri Van Becelaere, Amy Wiland, Richard C. Gowan, et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature medicine*. 1999;5(7): 810–816. <https://doi.org/10.1038/10533>.
245. D.P. Modest, I. Ricard, V. Heinemann, S. Hegewisch-Becker, W. Schmiegel, R. Porschen, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Annals of oncology*. 2016;27(9): 1746–1753. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW261>.

246. Julien Taieb, Aziz Zaanan, Karine Le Malicot, Catherine Julié, Hélène Blons, Laurent Mineur, et al. Prognostic Effect of BRAF and KRAS Mutations in Patients With Stage III Colon Cancer Treated With Leucovorin, Fluorouracil, and Oxaliplatin With or Without Cetuximab: A Post Hoc Analysis of the PETACC-8 Trial. *JAMA oncology*. 2016;2(5): 643–653. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2015.5225>.
247. J. Taieb ,Q. Shi, L. Pederson, S. Alberts, N. Wolmark, E. Van Cutsem, et al. Prognosis of microsatellite instability and/or mismatch repair deficiency stage III colon cancer patients after disease recurrence following adjuvant treatment: results of an ACCENT pooled analysis of seven studies. *Annals of oncology*. 2019;30(9): 1466–1471. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDZ208>.
248. A Rowland, M M Dias, M D Wiese, G Kichenadasse, R A McKinnon, C S Karapetis & M J Sorich, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2015;112(12): 1888–1894. <https://doi.org/10.1038/BJC.2015.173>.
249. Filippo Pietrantonio, Fausto Petrelli, Andrea Coinu, Maria Di Bartolomeo, Karen Borgonovo, Claudia Maggi, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *European journal of cancer*. 1990). 2015;51(5): 587–594. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2015.01.054>.
250. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyni es A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2015;21(11): 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.
251. C. Lepage, J.M. Phelip, L. CANY, E. Barbier, S. Manfredi, P. Deguiral, R. Faroux, M. Baconnier, D. Pezet, J. Duchmann, E. Terrebonne, A. Adenis, M. Benabdelghani, J. Ain, G. Breysacher, I. Boillot-Benedetto, A. Pelaquier, P. Prost, A. Lievre OB. 398O - Effect of 5 years of imaging and CEA follow-up to detect recurrence of colorectal cancer (CRC) - PRODIGE 13 a FFCD phase III trial. *Annals of Oncology*. 2020;31 (suppl_410). <https://doi.org/0.1016/annonc/annonc270>.
252. Vanessa Cottet, Veronique Bouvier, Fabien Rollot, Valérie Jooste, Laurent Bedenne, Jean Faivre, et al. Incidence and patterns of late recurrences in rectal cancer patients. *Annals of surgical oncology*. 2015;22(2): 520–527. <https://doi.org/10.1245/S10434-014-3990-1>.
253. Alice Frontali, Benjamin Benichou, Ionut Valcea, Léon Maggiori, Justine Prost   la Denise, Yves Panis. Is follow-up still mandatory more than 5 years after surgery for colorectal cancer? *Updates in surgery*. 2020;72(1): 55–60. <https://doi.org/10.1007/S13304-019-00678-5>.
254. Watson JD. The human genome project: past, present, and future. *Science*. 1990;248(4951): 44–49.

- <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2181665>.
255. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 1970;227(5258): 561–563.
<https://doi.org/10.1038/227561a0>.
256. Willyard C. New human gene tally reignites debate. *Nature*. 2018;558(7710): 354–355.
<https://doi.org/10.1038/D41586-018-05462-W>.
257. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *Nature*. 2003;422(6934): 835–847. <https://doi.org/10.1038/NATURE01626>.
258. Plasterk RHA. RNA silencing: the genome's immune system. *Science (New York, N.Y.)*. 2002;296(5571): 1263–1265. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1072148>.
259. Gerstein MB, Kundaje A, Hariharan M, Landt SG, Yan KK, Cheng C, et al. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature* 2012 489:7414. 2012;489(7414): 91–100. <https://doi.org/10.1038/nature11245>.
260. Adams BD, Parsons C, Walker L, Zhang WC, Slack FJ. Targeting noncoding RNAs in disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(3): 761–771. <https://doi.org/10.1172/JCI84424>.
261. Anastasiadou E, Jacob LS, Slack FJ. Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2017 18:1. 2017;18(1): 5–18. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99>.
262. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(24): 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/PNAS.242606799>.
263. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2017 16:3. 2017;16(3): 203–222.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>.
264. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2005;6(5): 376–385. <https://doi.org/10.1038/NRM1644>.
265. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5): 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).
266. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquienelli AE, Bettlnger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*.

- 2000;403(6772): 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>.
267. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808): 86–89. <https://doi.org/10.1038/35040556>.
268. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543): 853–858. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1064921>.
269. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*. 2001;294(5543): 858–862. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1065062>.
270. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(Database issue): D154. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM952>.
271. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*. 2004;23(20): 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600385>.
272. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014 15:8. 2014;15(8): 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
273. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014): 231–235. <https://doi.org/10.1038/NATURE03049>.
274. Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 2006 25:46. 2006;25(46): 6156–6162. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209908>.
275. Bracken CP, Scott HS, Goodall GJ. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2016. p. 719–732. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.134>.
276. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*. 2006;125(5): 887–901. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.03.043>.
277. Bohnsack MT, Czaplinski K, Görlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*. 2004;10(2): 185–191. <https://doi.org/10.1261/RNA.5167604>.

278. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(15): 5598–5603. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0400937101>.
279. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001;106(1): 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7).
280. Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes and Development*. 2001;15(20): 2654. <https://doi.org/10.1101/GAD.927801>.
281. Zhang B, Wang Q, Pan X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *Journal of Cellular Physiology*. 2007;210(2): 279–289. <https://doi.org/10.1002/jcp.20869>.
282. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2): 199–208. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1).
283. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009;136(2): 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
284. Navarro A. Deciphering miRNA-Target Relationships to Understand miRNA-Mediated Carcinogenesis. *Cancers*. 2021;13(10). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13102415>.
285. Navarro A, Monzó M. MicroRNAs in Human Embryonic and Cancer Stem Cells. *Yonsei Medical Journal*. 2010;51(5): 622. <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.5.622>.
286. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*. 2009;457(7228): 426–433. <https://doi.org/10.1038/NATURE07758>.
287. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1): D155–D162. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1141>.
288. Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene* 2010 29:15. 2010;29(15): 2161–2164. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.59>.
289. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19(1): 92–105. <https://doi.org/10.1101/GR.082701.108>.
290. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1): 20–51.

<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.03.006>.

291. Wang F, Ma Y, Wang H, Qin H. Reciprocal regulation between microRNAs and epigenetic machinery in colorectal cancer. *Oncology Letters*. 2017;13(3): 1048–1057.
<https://doi.org/10.3892/OL.2017.5593/HTML>.
292. Orang AV, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *International Journal of Genomics*. 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/970607>.
293. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*. 2003;301(5631): 336–338. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1085242>.
294. Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*. 2004;303(5666): 2022–2025. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1088060>.
295. Parker R, Sheth U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell*. 2007;25(5): 635–646. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.02.011>.
296. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(11): 4034–4039.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0510928103>.
297. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*. 2006;312(5770): 75–79.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1122689>.
298. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*. 2005;120(5): 623–634.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.12.038>.
299. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massierer K, Holtz J, Eachus R, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005;122(4): 553–563.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.07.031>.
300. Wang N, Zhou Z, Liao X, Zhang T. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure. *IUBMB Life*. 2009;61(6): 566–571. <https://doi.org/10.1002/IUB.204>.
301. Hu YB, Li CB, Song N, Zou Y, Chen S Di, Ren RJ, et al. Diagnostic value of microRNA for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2016;8(FEB): 13. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2016.00013/BIBTEX>.

302. Hawkes JE, Nguyen GH, Fujita M, Florell SR, Callis Duffin K, Krueger GG, et al. microRNAs in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016;136(2): 365–371. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.409>.
303. O'Reilly S. MicroRNAs in fibrosis: Opportunities and challenges. *Arthritis Research and Therapy*. 2016;18(1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13075-016-0929-X/TABLES/2>.
304. Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*. 2015;15(1): 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12935-015-0185-1/FIGURES/1>.
305. Morales S, Monzo M, Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomolecular Concepts*. 2017;8(5–6): 203–212. https://doi.org/10.1515/BMC-2017-0024/ASSET/GRAPHIC/J_BMC-2017-0024_EQ_2.JPG.
306. Morales S, Monzo M, Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomolecular Concepts*. 2017;8(5–6): 203–212. <https://doi.org/10.1515/bmc-2017-0024>.
307. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*. 2002;16(1): 6–21. <https://doi.org/10.1101/GAD.947102>.
308. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986 321:6067. 1986;321(6067): 209–213. <https://doi.org/10.1038/321209a0>.
309. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(11): 1148–1159. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA072067>.
310. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human Molecular Genetics*. 2007;16(R1): R50–R59. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDM018>.
311. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes and Development*. 2014;28(8): 812–828. <https://doi.org/10.1101/GAD.234294.113>.
312. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009;1(2): 239–259. <https://doi.org/10.2217/EPI.09.33>.
313. Jones PA, Gonzalgo ML. Altered DNA methylation and genome instability: A new pathway to cancer? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(6): 2103–2105. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.6.2103>.
314. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*. 2000;16(4): 168–174. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01971-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01971-X).

315. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(9): 2999–3004. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0307323101>.
316. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*. 2007;302(1): 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.08.028>.
317. Baer C, Claus R, Plass C. Genome-Wide Epigenetic Regulation of miRNAs in Cancer. *Cancer Research*. 2013;73(2): 473–477. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3731>.
318. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JCC, et al. Genetic and Epigenetic Silencing of MicroRNA-203 Enhances ABL1 and BCR-ABL1 Oncogene Expression. *Cancer Cell*. 2008;13(6): 496–506. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2008.04.018>.
319. Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of Drosophila microRNAs. *Genome Research*. 2007;17(12): 1850–1864. <https://doi.org/10.1101/GR.6597907>.
320. Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics 2011 12:1*. 2010;12(1): 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrg2905>.
321. Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2014 15:11*. 2014;15(11): 703–708. <https://doi.org/10.1038/nrm3890>.
322. Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, Vallböhmer D, Bollschweiler E, Brabender J, et al. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *International journal of oncology*. 2011;39(2): 409–415. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1036>.
323. Zhou M, Zeng J, Wang X, Wang X, Huang T, Fu Y, et al. Histone demethylase RBP2 decreases miR-21 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(2): 1249. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2859>.
324. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(7): 2257–2261. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0510565103>.



325. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs — the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:4. 2009;9(4): 293–302. <https://doi.org/10.1038/nrc2619>.
326. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2006;6(4): 259–269. <https://doi.org/10.1038/NRC1840>.
327. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009;136(2): 215–233. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.01.002>.
328. Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, Liang X, Weidhaas JB, Saltzman WM, et al. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(26). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1201516109>.
329. O’Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(17): 7113–7118. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0902636106>.
330. Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, Fitzpatrick SF, Cheong A, Scholz CC, et al. MicroRNA-155 Promotes Resolution of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Activity during Prolonged Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31(19): 4087. <https://doi.org/10.1128/MCB.01276-10>.
331. Cheng CJ, Bahal R, Babar IA, Pincus Z, Barrera F, Liu C, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumor microenvironment. *Nature*. 2015;518(7537): 107. <https://doi.org/10.1038/NATURE13905>.
332. Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer cell*. 2010;18(3): 282–293. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2010.08.013>.
333. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;467(7311): 86–90. <https://doi.org/10.1038/NATURE09284>.
334. Zhang J guang, Wang J jun, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang G hai. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411(11–12): 846–852. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2010.02.074>.
335. El Fatimy R, Subramanian S, Uhlmann EJ, Krichevsky AM. Genome Editing Reveals Glioblastoma Addiction to MicroRNA-10b. *Molecular therapy*. 2017;25(2): 368–378.

<https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2016.11.004>.

336. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research*. 2005;65(21): 9628–9632. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2352>.
337. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435(7043): 828–833. <https://doi.org/10.1038/NATURE03552>.
338. Hu T, Chong Y, Qin H, Kitamura E, Chang CS, Silva J, et al. The miR-17/92 cluster is involved in the molecular etiology of the SCLL syndrome driven by the BCR-FGFR1 chimeric kinase. *Oncogene*. 2018;37(14): 1926–1938. <https://doi.org/10.1038/S41388-017-0091-1>.
339. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics*. 2005;37(5): 495–500. <https://doi.org/10.1038/NG1536>.
340. Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 2010;42(8): 1348. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2010.03.004>.
341. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*. 2003;115(7): 787–798. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3).
342. Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 2008 27:41. 2008;27(41): 5477–5485. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.248>.
343. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang C V., Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005;435(7043): 839–843. <https://doi.org/10.1038/NATURE03677>.
344. Li SG, Shi QW, Yuan LY, Qin LP, Wang Y, Miao YQ, et al. C-Myc-dependent repression of two oncogenic miRNA clusters contributes to triptolide-induced cell death in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of experimental and clinical cancer research : CR*. 2018;37(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-018-0698-2>.
345. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJM, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*. 2006;124(6): 1169–1181. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.02.037>.
346. Champagne J, Pataskar A, Blommaert N, Peeper DS, Faller WJ, Agami R, et al. Oncogene-

- dependent sloppiness in mRNA translation. *Molecular Cell*. 2021;81: 4709–4721.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.09.002>.
347. Cheng CJ, Slack FJ. The duality of oncomiR addiction in the maintenance and treatment of cancer. *Cancer journal*. 2012;18(3): 232–237. <https://doi.org/10.1097/PPO.0B013E318258B75B>.
348. Gilles ME, Hao L, Brown K, Lim J, Bhatia SN, Slack FJ. Tumor penetrating nanomedicine targeting both an oncomiR and an oncogene in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2019;10(51): 5349. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27160>.
349. Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, et al. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene*. 2010;29(11): 1580–1587. <https://doi.org/10.1038/ONC.2009.445>.
350. 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(5): 635–647. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.01.014>.
351. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V., Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(39): 13944–13949. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506654102>.
352. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell*. 2010;17(1): 28–40. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.11.019>.
353. Concepcion CP, Han YC, Mu P, Bonetti C, Yao E, D’Andrea A, et al. Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice. *PLoS genetics*. 2012;8(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002797>.
354. Adams BD, Parsons C, Slack FJ. The tumor-suppressive and potential therapeutic functions of miR-34a in epithelial carcinomas. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2016;20(6): 737–753. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1114102>.
355. Adams BD, Wali VB, Cheng CJ, Inukai S, Booth CJ, Agarwal S, et al. miR-34a Silences c-SRC to Attenuate Tumor Growth in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer research*. 2016;76(4): 927–939. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2321>.
356. Kasinski AL, Slack FJ. miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma. *Cancer research*. 2012;72(21): 5576–5587. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2001>.
357. Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, et al. The microRNA miR-34a inhibits

- prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nature medicine*. 2011;17(2): 211–216. <https://doi.org/10.1038/NM.2284>.
358. Gallardo E, Navarro A, Viñolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, et al. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(11): 1903–1909. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp219>.
359. Pekarsky Y, Croce CM. Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL? *Oncotarget*. 2010;1(3): 224–227. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.129>.
360. Caramés C, Cristobal I, Moreno V, Marín JP, González-Alonso P, Torrejón B, et al. MicroRNA-31 Emerges as a Predictive Biomarker of Pathological Response and Outcome in Locally Advanced Rectal Cancer. *International Journal of Molecular Science*. 2016;17(17): 34–915. <https://doi.org/10.3390/ijms17060878>.
361. Della Vittoria Scarpati G, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, et al. A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;83(4): 1113–1119. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.09.030>.
362. Yang D, Sun Y, Hu L, Zheng H, Ji P, Pecot C V., et al. Integrated Analyses Identify a Master MicroRNA Regulatory Network for the Mesenchymal Subtype in Serous Ovarian Cancer. *Cancer Cell*. 2013;23(2): 186–199. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.12.020>.
363. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Søkilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, et al. The rectal cancer microRNAome--microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clinical cancer research*. 2012;18(18): 4919–4930. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0016>.
364. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, Wolff E, Hoffman MD, Pellatt DF, et al. Colorectal tumor molecular phenotype and miRNA: Expression profiles and prognosis. *Modern Pathology*. 2016;29(8): 915–927. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.73>.
365. Slattery ML, Wolff E, Hoffman MD, Pellatt DF, Milash B, Wolff RK. MicroRNAs and colon and rectal cancer: differential expression by tumor location and subtype. *Genes, chromosomes & cancer*. 2011;50(3): 196–206. <https://doi.org/10.1002/GCC.20844>.
366. Eslamizadeh S, Zare AA, Talebi A, Tabaeian SP, Eshkiki ZS, Heydari-Zarnagh H, et al. Differential Expression of miR-20a and miR-145 in Colorectal Tumors as Potential Location-specific miRNAs. *MicroRNA*. 2021;10(1): 66–73. <https://doi.org/10.2174/2211536609666201221123604>.

367. Li X, Zhang G, Luo F, Ruan J, Huang D, Feng D, et al. Identification of aberrantly expressed miRNAs in rectal cancer. *Oncology reports*. 2012;28(1): 77–84. <https://doi.org/10.3892/OR.2012.1769>.
368. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Søkilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, et al. The rectal cancer microRNAome--microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clinical cancer research*. 2012;18(18): 4919–4930. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0016>.
369. Wang M, Zhang P, Li Y, Liu G, Zhou B, Zhan L, et al. The quantitative analysis by stem-loop real-time PCR revealed the microRNA-34a, microRNA-155 and microRNA-200c overexpression in human colorectal cancer. *Medical oncology*. 2012;29(5): 3113–3118. <https://doi.org/10.1007/S12032-012-0241-9>.
370. Valastyan S, Weinberg RA. miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell cycle*. 2010;9(11): 2124–2129. <https://doi.org/10.4161/CC.9.11.11843>.
371. Laurila EM, Kallioniemi A. The diverse role of miR-31 in regulating cancer associated phenotypes. *Genes, chromosomes & cancer*. 2013;52(12): 1103–1113. <https://doi.org/10.1002/GCC.22107>.
372. Valeri N, Braconi C, Gasparini P, Murgia C, Lampis A, Paulus-Hock V, et al. MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer cell*. 2014;25(4): 469–483. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2014.03.006>.
373. Wang Y, Mu L, Huang M. MicroRNA-195 suppresses rectal cancer growth and metastasis via regulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Molecular medicine reports*. 2019;20(5): 4449–4458. <https://doi.org/10.3892/MMR.2019.10717>.
374. Zhang DL, Yang N. MiR-3174 functions as an oncogene in rectal cancer by targeting PCBD2. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2019;23(6): 2417–2426. https://doi.org/10.26355/EURREV_201903_17388.
375. Xu XH, Wu XB, Wu SB, Liu HB, Chen R, Li Y. Identification of miRNAs differentially expressed in clinical stages of human colorectal carcinoma-an investigation in Guangzhou, China. *PloS one*. 2014;9(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094060>.
376. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, Valeri N, Stevens J, Caan BJ, et al. An evaluation and replication of miRNAs with disease stage and colorectal cancer-specific mortality. *International journal of cancer*. 2015;137(2): 428–438. <https://doi.org/10.1002/IJC.29384>.
377. Nielsen BS, Jørgensen S, Fog JU, Søkilde R, Christensen IJ, Hansen U, et al. High levels of microRNA-21 in the stroma of colorectal cancers predict short disease-free survival in stage II

- colon cancer patients. *Clinical and experimental metastasis*. 2011;28(1): 27–38.
<https://doi.org/10.1007/S10585-010-9355-7>.
378. Yang Y, Peng W, Tang T, Xia L, Wang XD, Duan BF, et al. MicroRNAs as promising biomarkers for tumor-staging: evaluation of MiR21 MiR155 MiR29a and MiR92a in predicting tumor stage of rectal cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(13): 5175–5180.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.13.5175>.
379. Baek DW, Kim G, Kang BW, Kim HJ, Park SY, Park JS, et al. High expression of microRNA-199a-5p is associated with superior clinical outcomes in patients with locally advanced rectal cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2020;146(1): 105–115.
<https://doi.org/10.1007/S00432-019-03099-4>.
380. Svoboda M, Izakovicova Holla L, Sefr R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, et al. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *International journal of oncology*. 2008;33(3): 541–547.
381. Svoboda M, Sana J, Fabian P, Kocakova I, Gombosova J, Nekvindova J, et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiation Oncology*. 2012;7(1): 195. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-195>.
382. Kheirelseid EAH, Miller N, Chang KH, Curran C, Hennessey E, Sheehan M, et al. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy. *International Journal of Colorectal Disease*. 2013;28(2): 247–260. <https://doi.org/10.1007/s00384-012-1549-9>.
383. Hotchi M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Morimoto S, et al. microRNA expression is able to predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Molecular and Clinical Oncology*. 2012;1(1): 137–142. <https://doi.org/10.3892/mco.2012.9>.
384. Lopes-Ramos CM, Habr-Gama A, Quevedo B de S, Felício NM, Bettoni F, Koyama FC, et al. Overexpression of miR-21-5p as a predictive marker for complete tumor regression to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *BMC Medical Genomics*. 2014;7(1): 68.
<https://doi.org/10.1186/s12920-014-0068-7>.
385. Bhangu A, Wood G, Brown G, Darzi A, Tekkis P, Goldin R. The role of epithelial mesenchymal transition and resistance to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *Colorectal disease*. 2014;16(4). <https://doi.org/10.1111/CODI.12482>.

386. Azizian A, Kramer F, Jo P, Wolff HA, Beißbarth T, Skarupke R, et al. Preoperative Prediction of Lymph Node Status by Circulating Mir-18b and Mir-20a During Chemoradiotherapy in Patients with Rectal Cancer. *World journal of surgery*. 2015;39(9): 2329–2335. <https://doi.org/10.1007/S00268-015-3083-8>.
387. Chen W, Wang W. Serum hsa-miR-30e As a Potential Biomarker to Predict the Effect of Neoadjuvant Chemoradiation Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2021;25(11): 696–706. <https://doi.org/10.1089/GTMB.2020.0300>.
388. Kral J, Korenkova V, Novosadova V, Langerova L, Schneiderova M, Liska V, et al. Expression profile of miR-17/92 cluster is predictive of treatment response in rectal cancer. *Carcinogenesis*. 2018;39(11): 1359–1367. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGY100>.
389. Machackova T, Trachtova K, Prochazka V, Grolich T, Farkasova M, Fiala L, et al. Tumor microRNAs Identified by Small RNA Sequencing as Potential Response Predictors in Locally Advanced Rectal Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Cancer genomics & proteomics*. 2020;17(3): 249–257. <https://doi.org/10.21873/CGP.20185>.
390. Cervena K, Novosadova V, Pardini B, Naccarati A, Opattova A, Horak J, et al. Analysis of MicroRNA Expression Changes During the Course of Therapy In Rectal Cancer Patients. *Frontiers in oncology*. 2021;11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.702258>.
391. Salendo J, Spitzner M, Kramer F, Zhang X, Jo P, Wolff HA, et al. Identification of a microRNA expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells, involving miRNAs-320a, -224, -132 and let7g. *Radiotherapy and oncology*. 2013;108(3): 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.032>.
392. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007 447:7146. 2007;447(7146): 799–816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>.
393. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009 458:7235. 2009;458(7235): 223–227. <https://doi.org/10.1038/nature07672>.
394. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Morales DR, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(28): 11667–11672. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0904715106>.

395. Bhan A, Mandal SS. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1856(1): 151–164. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2015.07.001>.
396. Bhan A, Mandal SS. Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease. *ChemMedChem*. 2014;9(9): 1932–1956. <https://doi.org/10.1002/CMDC.201300534>.
397. Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA biology*. 2013;10(6): 924–933. <https://doi.org/10.4161/RNA.24604>.
398. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*. 2011;43(6): 904–914. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.08.018>.
399. Pontier DB, Gribnau J. Xist regulation and function explored. *Human genetics*. 2011;130(2): 223–236. <https://doi.org/10.1007/S00439-011-1008-7>.
400. Shi T, Gao G, Cao Y. Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics. *Disease markers*. 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9085195>.
401. Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer cell*. 2016;29(4): 452. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2016.03.010>.
402. Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*. 2003;300(5616): 131–135. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1084274/SUPPL_FILE/PLATH.SOM.PDF.
403. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*. 2008;322(5902): 750–756. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1163045/SUPPL_FILE/ZHAO.SOM.PDF.
404. Schorderet P, Duboule D. Structural and Functional Differences in the Long Non-Coding RNA Hotair in Mouse and Human. *PLOS Genetics*. 2011;7(5): e1002071. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002071>.
405. Li L, Liu B, Wapinski OL, Tsai MC, Qu K, Zhang J, et al. Targeted Disruption of Hotair Leads to Homeotic Transformation and Gene Derepression. *Cell Reports*. 2013;5(1): 3–12. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2013.09.003>.
406. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, et al. Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7): 1311–1323. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.05.022/ATTACHMENT/9D2ADAA6-D149-4ECC-AE12->

4B630E4A0AF9/MMC6.XLS.

407. Hu X, Feng Y, Zhang D, Zhao SD, Hu Z, Greshock J, et al. A Functional Genomic Approach Identifies FAL1 as an Oncogenic Long Noncoding RNA that Associates with BMI1 and Represses p21 Expression in Cancer. *Cancer Cell*. 2014;26(3): 344–357.
<https://doi.org/10.1016/J.CCR.2014.07.009/ATTACHMENT/52252D8B-76BC-4660-81A7-B068971A991D/MMC11.XLSX>.
408. Negishi M, Wongpalee SP, Sarkar S, Park J, Lee KY, Shibata Y, et al. A new lncRNA, APTR, associates with and represses the CDKN1A/p21 promoter by recruiting polycomb proteins. *PLoS one*. 2014;9(4): e95216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095216>.
409. Pasmant E, Laurendeau I, Héron D, Vidaud M, Vidaud D, Bièche I. Characterization of a Germ-Line Deletion, Including the Entire INK4/ARF Locus, in a Melanoma-Neural System Tumor Family: Identification of ANRIL, an Antisense Noncoding RNA Whose Expression Coclusters with ARF. *Cancer Research*. 2007;67(8): 3963–3969. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2004>.
410. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 7:9. 2006;7(9): 667–677.
<https://doi.org/10.1038/nrm1987>.
411. Pasmant E, Laurendeau I, Héron D, Vidaud M, Vidaud D, Bièche I. Characterization of a Germ-Line Deletion, Including the Entire INK4/ARF Locus, in a Melanoma-Neural System Tumor Family: Identification of ANRIL, an Antisense Noncoding RNA Whose Expression Coclusters with ARF. *Cancer Research*. 2007;67(8): 3963–3969. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2004>.
412. Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular Interplay of the Noncoding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a. *Molecular Cell*. 2010;38(5): 662–674.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.03.021/ATTACHMENT/0B9ECFA5-CE9E-43A7-B3B8-530B083430E0/MMC1.PDF>.
413. O’Leary VB, Ovsepian SV, Carrascosa LG, Buske FA, Radulovic V, Niyazi M, et al. PARTICLE, a triplex-forming long ncRNA, regulates locus-specific methylation in response to low-dose irradiation. *Cell Reports*. 2015;11(3): 474–485.
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.03.043/ATTACHMENT/8BCB99FA-BCB3-4443-B8FA-BA0EB0A54BEA/MMC1.PDF>.
414. Arab K, Park YJ, Lindroth AM, Schäfer A, Oakes C, Weichenhan D, et al. Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A.

Molecular Cell. 2014;55(4): 604–614.

<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.06.031/ATTACHMENT/5C59B60C-EEEE-4333-BF1B-2011C439A379/MMC2.XLSX>.

415. Di Ruscio A, Ebralidze AK, Benoukraf T, Amabile G, Goff LA, Terragni J, et al. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature* 2013 503:7476. 2013;503(7476): 371–376. <https://doi.org/10.1038/nature12598>.
416. Prensner JR, Iyer MK, Sahu A, Asangani IA, Cao Q, Patel L, et al. The long noncoding RNA SChLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex. *Nature Genetics* 2013 45:11. 2013;45(11): 1392–1398. <https://doi.org/10.1038/ng.2771>.
417. Wang Y, He L, Du Y, Zhu P, Huang G, Luo J, et al. The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling. *Cell stem cell*. 2015;16(4): 413–425. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.03.003>.
418. Rapicavoli NA, Qu K, Zhang J, Mikhail M, Laberge RM, Chang HY. A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and antiinflammatory therapeutics. *eLife*. 2013;2013(2). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.00762>.
419. Krawczyk M, Emerson BM. p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF- κ B complexes. *eLife*. 2014;3(3). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.01776>.
420. Wang P, Xue Y, Han Y, Lin L, Wu C, Xu S, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA Inc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science*. 2014;344(6181): 310–313. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1251456/SUPPL_FILE/WANG.SM.PDF.
421. Xing Z, Lin A, Li C, Liang K, Wang S, Liu Y, et al. LncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell*. 2014;159(5): 1110–1125. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.10.013/ATTACHMENT/DF2CFF58-14DE-4F3D-AE52-72FD281052E7/MMC5.XLSX>.
422. Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 2010 465:7295. 2010;465(7295): 182–187. <https://doi.org/10.1038/nature09033>.
423. Koch F, Fenouil R, Gut M, Cauchy P, Albert TK, Zacarias-Cabeza J, et al. Transcription initiation platforms and GTF recruitment at tissue-specific enhancers and promoters. *Nature Structural and Molecular Biology* 2011 18:8. 2011;18(8): 956–963. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2085>.

424. Natoli G, Andrau JC. Noncoding Transcription at Enhancers: General Principles and Functional Models. *Annual reviews*. 2012;46: 1–19. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-110711-155459>.
425. Yang L, Lin C, Jin C, Yang JC, Tanasa B, Li W, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. *Nature* 2013 500:7464. 2013;500(7464): 598–602. <https://doi.org/10.1038/nature12451>.
426. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biology*. 2012. p. 703–719. <https://doi.org/10.4161/rna.20481>.
427. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular Cell*. 2010;39(6): 925–938. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.08.011/ATTACHMENT/A223B9DB-D680-4B95-9348-B13C3680D72F/MMC4.MOV>.
428. Lee S, Kopp F, Chang TC, Sataluri A, Chen B, Sivakumar S, et al. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell*. 2016;164(1–2): 69–80. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.12.017/ATTACHMENT/7D0C59C7-699B-4C6C-9499-86A367A2C475/MMC5.XLSX>.
429. Dey BK, Pfeifer K, Dutta A. The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes & Development*. 2014;28(5): 491–501. <https://doi.org/10.1101/GAD.234419.113>.
430. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 1996 379:6561. 1996;379(6561): 131–137. <https://doi.org/10.1038/379131a0>.
431. Nakagawa S, Shimada M, Yanaka K, Mito M, Arai T, Takahashi E, et al. The lncRNA Neat1 is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. *Development*. 2014;141(23): 4618–4627. <https://doi.org/10.1242/DEV.110544>.
432. Balas MM, Johnson AM. Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer. *Non-coding RNA research*. 2018;3(3): 108–117. <https://doi.org/10.1016/J.NCRNA.2018.03.001>.
433. Diederichs S. The four dimensions of noncoding RNA conservation. *Trends in Genetics*. 2014;30(4): 121–123. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2014.01.004>.
434. Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel

- noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2003 22:39. 2003;22(39): 8031–8041. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206928>.
435. Srikantan V, Zou Z, Petrovics G, Xu L, Augustus M, Davis L, et al. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(22): 12216–12221. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.22.12216>.
436. Yan X, Hu Z, Feng Y, Hu X, Yuan J, Zhao SD, et al. Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. *Cancer Cell*. 2015;28(4): 529–540. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2015.09.006/ATTACHMENT/277F4519-C557-4BA0-B19C-18763A57FDBA/MMC9.XLSX>.
437. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*. 2013;6(269): p11–p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>.
438. Gutschner T, Hämmerle M, Eißmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G, et al. The Noncoding RNA MALAT1 Is a Critical Regulator of the Metastasis Phenotype of Lung Cancer Cells. *Cancer Research*. 2013;73(3): 1180–1189. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2850>.
439. Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular Interplay of the Noncoding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a. *Molecular Cell*. 2010;38(5): 662–674. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.03.021/ATTACHMENT/0B9ECFA5-CE9E-43A7-B3B8-530B083430E0/MMC1.PDF>.
440. Wan G, Mathur R, Hu X, Liu Y, Zhang X, Peng G, et al. Long non-coding RNA ANRIL (CDKN2B-AS) is induced by the ATM-E2F1 signaling pathway. *Cellular signalling*. 2013;25(5): 1086–1095. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2013.02.006>.
441. Montes M, Nielsen MM, Maglieri G, Jacobsen A, Højfeldt J, Agrawal-Singh S, et al. The lncRNA MIR31HG regulates p16INK4A expression to modulate senescence. *Nature Communications* 2015 6:1. 2015;6(1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms7967>.
442. Kumar P P, Emechebe U, Smith R, Franklin S, Moore B, Yandell M, et al. Coordinated control of senescence by lncRNA and a novel T-box3 co-repressor complex. *eLife*. 2014;3. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.02805>.
443. Groff AF, Sanchez-Gomez DB, Soruco MML, Gerhardinger C, Barutcu AR, Li E, et al. In Vivo Characterization of Linc-p21 Reveals Functional cis-Regulatory DNA Elements. *Cell Reports*.

- 2016;16(8): 2178–2186. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.050>.
444. Melo CA, Léveillé N, Rooijers K, Wijchers PJ, Geeven G, Tal A, et al. A p53-bound enhancer region controls a long intergenic noncoding RNA required for p53 stress response. *Oncogene*. 2016;35(33): 4399–4406. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.502>.
445. Chaleshi V, Irani S, Alebouyeh M, Mirfakhraie R, Aghdaei HA. Association of lincRNA-p53 regulatory network (lincRNA-p21, lincRNA-ROR and MALAT1) and p53 with the clinicopathological features of colorectal primary lesions and tumors. *Oncology Letters*. 2020;19(6): 3937–3949. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11518>.
446. Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. 2010;142(3): 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.040>.
447. Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer research*. 2017;77(15): 3965–3981. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>.
448. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. 2010;329(5992): 689–693. <https://doi.org/10.1126/science.1192002>.
449. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010;464(7291): 1071–1076. <https://doi.org/10.1038/nature08975>.
450. Pawłowska E, Szczepanska J, Blasiak J. The Long Noncoding RNA HOTAIR in Breast Cancer: Does Autophagy Play a Role? *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS18112317>.
451. Leucci E, Vendramin R, Spinazzi M, Laurette P, Fiers M, Wouters J, et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature* 2016 531:7595. 2016;531(7595): 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature17161>.
452. Vendramin R, Verheyden Y, Ishikawa H, Goedert L, Nicolas E, Saraf K, et al. SAMMSON fosters cancer cell fitness by concertedly enhancing mitochondrial and cytosolic translation. *Nature structural & molecular biology*. 2018;25(11): 1035–1046. <https://doi.org/10.1038/S41594-018-0143-4>.
453. Hosono Y, Niknafs YS, Prensner JR, Iyer MK, Dhanasekaran SM, Mehra R, et al. Oncogenic Role of THOR, a Conserved Cancer/Testis Long Non-coding RNA. *Cell*. 2017;171(7): 1559-1572.e20.

<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.11.040>.

454. Zhang Y, Pitchiaya S, Cieřlik M, Niknafs YS, Tien JCY, Hosono Y, et al. Analysis of the androgen receptor-regulated lncRNA landscape identifies a role for ARLNC1 in prostate cancer progression. *Nature genetics*. 2018;50(6): 814–824. <https://doi.org/10.1038/S41588-018-0120-1>.
455. Niknafs YS, Han S, Ma T, Speers C, Zhang C, Wilder-Romans K, et al. The lncRNA landscape of breast cancer reveals a role for DSCAM-AS1 in breast cancer progression. *Nature communications*. 2016;7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS12791>.
456. Zhang X, Rice K, Wang Y, Chen W, Zhong Y, Nakayama Y, et al. Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology*. 2010;151(3): 939–947. <https://doi.org/10.1210/EN.2009-0657>.
457. Mondal T, Subhash S, Vaid R, Enroth S, Uday S, Reinius B, et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF- β pathway genes through formation of RNA–DNA triplex structures. *Nature Communications 2015 6:1*. 2015;6(1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms8743>.
458. Lu K hua, Li W, Liu X hua, Sun M, Zhang M ling, Wu W qin, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer*. 2013;13(1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-461/FIGURES/6>.
459. Pickard MR, Williams GT. The hormone response element mimic sequence of GAS5 lncRNA is sufficient to induce apoptosis in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(9): 10104. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7173>.
460. Zhao X, Wang P, Liu J, Zheng J, Liu Y, Chen J, et al. Gas5 Exerts Tumor-suppressive Functions in Human Glioma Cells by Targeting miR-222. *Molecular Therapy*. 2015;23(12): 1899. <https://doi.org/10.1038/MT.2015.170>.
461. Liu B, Sun L, Liu Q, Gong C, Yao Y, Lv X, et al. A cytoplasmic NF- κ B interacting long noncoding RNA blocks I κ B phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. *Cancer cell*. 2015;27(3): 370–381. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2015.02.004>.
462. Huang D, Chen J, Yang L, Ouyang Q, Li J, Lao L, et al. NKILA lncRNA promotes tumor immune evasion by sensitizing T cells to activation-induced cell death. *Nature immunology*. 2018;19(10): 1112–1125. <https://doi.org/10.1038/S41590-018-0207-Y>.
463. Deng Y, Zhang F, Sun ZG, Wang S. Development and Validation of a Prognostic Signature Associated With Tumor Microenvironment Based on Autophagy-Related lncRNA Analysis in Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in medicine*. 2021;8.

<https://doi.org/10.3389/FMED.2021.762570>.

464. Xie X, Tang B, Xiao YF, Xie R, Li BS, Dong H, et al. Long non-coding RNAs in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(5): 5226. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6446>.
465. Li H, Ma SQ, Huang J, Chen XP, Zhou HH. Roles of long noncoding RNAs in colorectal cancer metastasis. *Oncotarget*. 2017;8(24): 39859–39876. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16339>.
466. Xu MD, Qi P, Du X. Long non-coding RNAs in colorectal cancer: implications for pathogenesis and clinical application. *Modern Pathology 2014 27:10*. 2014;27(10): 1310–1320. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.33>.
467. Lizarbe MA, Calle-Espinosa J, Fernández-Lizarbe E, Fernández-Lizarbe S, Robles MÁ, Olmo N, et al. Colorectal Cancer: From the Genetic Model to Posttranscriptional Regulation by Noncoding RNAs. *BioMed Research International*. 2017; 2017:7354260. <https://doi.org/10.1155/2017/7354260>.
468. Kam Y, Rubinstein A, Naik S, Djavsarov I, Halle D, Ariel I, et al. Detection of a long non-coding RNA (CCAT1) in living cells and human adenocarcinoma of colon tissues using FIT-PNA molecular beacons. *Cancer letters*. 2014;352(1): 90–96. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2013.02.014>.
469. Wang J, Song YX, Ma B, Wang JJ, Sun JX, Chen XW, et al. Regulatory Roles of Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer. *OPEN ACCESS International Journal of Molecular Science* 2015;16: 16. <https://doi.org/10.3390/ijms160819886>.
470. Dou J, Ni Y, He X, Wu D, Li M, Wu S, et al. Decreasing lncRNA HOTAIR expression inhibits human colorectal cancer stem cells. *American Journal of Translational Research*. 2016;8(1): 98–108.
471. Svoboda M, Slyskova J, Schneiderova M, Makovicky P, Bielik L, Levy M, et al. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*. 2014;35(7). <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGU055>.
472. Luo J, Qu J, Wu DK, Lu ZL, Sun YS, Qu Q. Long non-coding RNAs: a rising biotarget in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(13): 22187–22202. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14728>.
473. Yang MH, Hu ZY, Xu C, Xie LY, Wang XY, Chen SY, et al. MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9. *Biochimica et biophysica*

- acta*. 2015;1852(1): 166–174. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2014.11.013>.
474. Hu ZY, Wang XY, Guo W Bin, Xie LY, Huang YQ, Liu YP, et al. Long non-coding RNA MALAT1 increases AKAP-9 expression by promoting SRPK1-catalyzed SRSF1 phosphorylation in colorectal cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(10): 11733. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7367>.
475. Catana CS, Pichler M, Giannelli G, Mader RM, Berindan-Neagoe I. Non-coding RNAs, the Trojan horse in two-way communication between tumor and stroma in colorectal and hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(17): 29519. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15706>.
476. Bian Z, Jin L, Zhang J, Yin Y, Quan C, Hu Y, et al. LncRNA-UCA1 enhances cell proliferation and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by inhibiting miR-204-5p. *Scientific Reports*. 2016;6:23892. <https://doi.org/10.1038/SREP23892>.
477. Galamb O, Barták BK, Kalmár A, Nagy ZB, Szigeti KA, Tulassay Z, et al. Diagnostic and prognostic potential of tissue and circulating long non-coding RNAs in colorectal tumors. *World Journal of Gastroenterology*. 2019. 5026–5048. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i34.5026>.
478. Liu T, Zhang X, Yang YM, Du LT, Wang CX. Increased expression of the long noncoding RNA CRNDE-h indicates a poor prognosis in colorectal cancer, and is positively correlated with IRX5 mRNA expression. *OncoTargets and therapy*. 2016;9: 1437–1448. <https://doi.org/10.2147/OTT.S98268>.
479. Han P, Li J wen, Zhang B miao, Lv J chen, Li Y min, Gu X yue, et al. The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Molecular cancer*. 2017;16(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-017-0583-1>.
480. Schwarzenbach H. Biological and Clinical Relevance of H19 in Colorectal Cancer Patients. *EBioMedicine*. 2016;13: 9. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2016.11.001>.
481. Chen T, Yang P, Wang H, He ZY. Silence of long noncoding RNA PANDAR switches low-dose curcumin-induced senescence to apoptosis in colorectal cancer cells. *OncoTargets and therapy*. 2017;10: 483–491. <https://doi.org/10.2147/OTT.S127547>.
482. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science signaling*. 2010;3(107):ra8. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2000568>.
483. Saus E, Brunet-Vega A, Iraola-Guzmán S, Pegueroles C, Gabaldón T, Pericay C. Long non-coding

- RNAs as potential novel prognostic biomarkers in colorectal cancer. *Frontiers in Genetics*. 2016;7: 54. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2016.00054/BIBTEX>.
484. Chillón I, Pyle AM. Inverted repeat Alu elements in the human lincRNA-p21 adopt a conserved secondary structure that regulates RNA function. *Nucleic acids research*. 2016;44(19): 9462–9471. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW599>.
485. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, Soukup D, Resnick R, Sarma K, et al. LincRNA-p21 Activates p21 In cis to Promote Polycomb Target Gene Expression and to Enforce the G1/S Checkpoint. *Molecular Cell*. 2014;54(5): 777–790. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.025>.
486. Yoon JH, Srikantan S, Gorospe M. MS2-TRAP (MS2-tagged RNA affinity purification): tagging RNA to identify associated miRNAs. *Methods*. 2012;58(2): 81–87. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2012.07.004>.
487. Ding G, Peng Z, Shang J, Kang Y, Ning H, Mao C. LincRNA-p21 inhibits invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma through miR-9/E-cadherin cascade signaling pathway molecular mechanism. *OncoTargets and therapy*. 2017;10: 3241. <https://doi.org/10.2147/OTT.S134910>.
488. Wang X, Ruan Y, Wang X, Zhao W, Jiang Q, Jiang C, et al. Long intragenic non-coding RNA lincRNA-p21 suppresses development of human prostate cancer. *Cell Proliferation*. 2017;50(2): 50. <https://doi.org/10.1111/CPR.12318>.
489. Özgür E, Mert U, Isin M, Okutan M, Dalay N, Gezer U. Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells. *Clinical and experimental medicine*. 2013;13(2): 119–126. <https://doi.org/10.1007/S10238-012-0181-X>.
490. Jin S, Yang X, Li J, Yang W, Ma H, Zhang Z. P53-targeted lincRNA-p21 acts as a tumor suppressor by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*. 2019;18(1): 38. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0993-3>.
491. Hall JR, Messenger ZJ, Tam HW, Phillips SL, Recio L, Smart RC. Long noncoding RNA lincRNA-p21 is the major mediator of UVB-induced and p53-dependent apoptosis in keratinocytes. *Cell death & disease*. 2015;6(3): e1700. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.67>.
492. Tang SS, Zheng BY, Xiong XD. LincRNA-p21: Implications in Human Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(8): 18732–18740. <https://doi.org/10.3390/IJMS160818732>.
493. Chen Y, Wei G, Xia H, Yu H, Tang Q, Bi F. Down regulation of lincRNA-p21 contributes to gastric cancer development through Hippo-independent activation of YAP. *Oncotarget*. 2017;8(38): 63813. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19130>.

494. Blume CJ, Hotz-Wagenblatt A, Hüllein J, Sellner L, Jethwa A, Stolz T, et al. p53-dependent non-coding RNA networks in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(10): 2015–2023. <https://doi.org/10.1038/LEU.2015.119>.
495. Castellano JJ, Navarro A, Vinólas N, Marrades RM, Moises J, Cordeiro A, et al. LincRNA-p21 Impacts Prognosis in Resected Non-Small Cell Lung Cancer Patients through Angiogenesis Regulation. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016;11(12): 2173–2182. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.07.015>.
496. Helsmoortel H, Everaert C, Lumen N, Ost P, Vandesompele J. Detecting long non-coding RNA biomarkers in prostate cancer liquid biopsies: Hype or hope? *Non-coding RNA Research*. 2018;3(2): 64. *KeAi*. <https://doi.org/10.1016/J.NCRNA.2018.05.001>.
497. Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. 2010;142(3): 409–419. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.06.040/ATTACHMENT/28F0B509-CCFE-477B-B432-CA629BA66EED/MMC4.XLS>.
498. Wu G, Cai J, Han Y, Chen J, Huang ZP, Chen C, et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation*. 2014;130(17): 1452–1465. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011675>.
499. Tran UM, Rajarajacholan U, Soh J, Kim TS, Thalappilly S, Sensen CW, et al. LincRNA-p21 acts as a mediator of ING1b-induced apoptosis. *Cell Death and Disease*. 2015;6(3): e1668. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2015.15>.
500. Yang T, Zhang W, Wang L, Xiao C, Guo B, Gong Y, et al. Long intergenic noncoding RNA-p21 inhibits apoptosis by decreasing PUMA expression in non-small cell lung cancer. *The Journal of International Medical Research*. 2019;47(1): 481. <https://doi.org/10.1177/0300060518816592>.
501. Ma J, Feng Y, Liu Y, Li X. PUMA and survivin are involved in the apoptosis of HepG2 cells induced by microcystin-LR via mitochondria-mediated pathway. *Chemosphere*. 2016;157: 241–249. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.05.051>.
502. Jabbour AM, Heraud JE, Daunt CP, Kaufmann T, Sandow J, O'Reilly LA, et al. Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim. *Cell Death and Differentiation*. 2009;16(4): 555–563. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.179>.

503. Zhang Y, Xing D, Liu L. PUMA promotes bax translocation by both directly interacting with bax and by competitive binding to Bcl-XL during UV-induced apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*. 2009;20(13): 3077–3087. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-11-1109>.
504. Zhang Y, Miao Y, Shang M, Liu M, Liu R, Pan E, et al. LincRNA-p21 leads to G1 arrest by p53 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer management and research*. 2019;11: 6201–6214. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S197557>.
505. Ye Y, Peng Y, Li Y, Liu C, Xu Y, Li W. Effect of lincRNA-p21 targeting HIF-1 α on biological functions of liver cancer cells. *Oncology letters*. 2019;17(6): 4964–4968. <https://doi.org/10.3892/OL.2019.10195>.
506. Xia W, Zhuang L, Deng X, Hou M. Long noncoding RNA-p21 modulates cellular senescence via the Wnt/ β -catenin signaling pathway in mesenchymal stem cells. *Molecular medicine reports*. 2017;16(5): 7039–7047. <https://doi.org/10.3892/MMR.2017.7430>.
507. Amirinejad R, Rezaei M, Shirvani-Farsani Z. An update on long intergenic noncoding RNA p21: a regulatory molecule with various significant functions in cancer. *Cell and bioscience*. 2020;10(1). <https://doi.org/10.1186/S13578-020-00445-9>.
508. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191): 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
509. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(5): 343–354. <https://doi.org/10.1038/NRM1366>.
510. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*. 2008;30(4): 393–402. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2008.04.009>.
511. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001;292(5516): 464–468. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1059817>.
512. Yang F, Zhang H, Mei Y, Wu M. Reciprocal Regulation of HIF-1 α and LincRNA-p21 Modulates the Warburg Effect. *Molecular Cell*. 2014;53(1): 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.004>.
513. Chen S, Liang H, Yang H, Zhou K, Xu L, Liu J, et al. LincRNA-p21: function and mechanism in cancer. *Medical oncology*. 2017;34(5). <https://doi.org/10.1007/S12032-017-0959-5>.
514. Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Molecular cell*. 2012;47(4): 648–655.

<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.06.027>.

515. Wang J, Lei ZJ, Guo Y, Wang T, Qin ZY, Xiao HL, et al. miRNA-regulated delivery of lincRNA-p21 suppresses β -catenin signaling and tumorigenicity of colorectal cancer stem cells. *Oncotarget*. 2015;6(35): 37852–37870. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5635>.
516. Isin M, Ozgur E, Cetin G, Erten N, Aktan M, Gezer U, et al. Investigation of circulating lincRNAs in B-cell neoplasms. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;431: 255–259. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2014.02.010>.
517. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature Cell Biology*. 2008;10(3): 295–305. <https://doi.org/10.1038/ncb1691>.
518. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*. 2013;342(6159): 1234850. <https://doi.org/10.1126/science.1234850>.
519. Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*. 2013;502(7469): 65–70. <https://doi.org/10.1038/NATURE12587>.
520. Bao X, Wu H, Zhu X, Guo X, Hutchins AP, Luo Z, et al. The p53-induced lincRNA-p21 derails somatic cell reprogramming by sustaining H3K9me3 and CpG methylation at pluripotency gene promoters. *Cell research*. 2015;25(1): 80–92. <https://doi.org/10.1038/CR.2014.165>.
521. Wei SC, Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, et al. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nature Cell Biology*. 2015;17(5): 678–688. <https://doi.org/10.1038/ncb3157>.
522. Mathias RA, Gopal SK, Simpson RJ. Contribution of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to the tumour microenvironment. *Journal of Proteomics*. 2013. p. 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.10.016>.
523. Lou Y, Diao L, Cuentas ERP, Denning WL, Chen L, Fan YH, et al. Epithelial-mesenchymal transition is associated with a distinct tumor microenvironment including elevation of inflammatory signals and multiple immune checkpoints in lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(14): 3630–3642. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1434>.
524. Jia M, Jiang L, Wang YD, Huang JZ, Yu M, Xue HZ. lincRNA-p21 inhibits invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma through Notch signaling-induced epithelial-mesenchymal transition. *Hepatology Research*. 2016;46(11): 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/hepr.12659>.

525. Tsuchiya Y, Sawada S, Yoshioka I, Ohashi Y, Matsuo M, Harimaya Y, et al. Increased surgical stress promotes tumor metastasis. *Surgery*. 2003;133(5): 547–555.
<https://doi.org/10.1067/msy.2003.141>.
526. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*. 2006;2(3): 213–219. <https://doi.org/10.2147/VHRM.2006.2.3.213>.
527. Rajabi M, Mousa SA. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines*. 2017;5(2).
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES5020034>.
528. Kumar MM, Goyal R. LncRNA as a Therapeutic Target for Angiogenesis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017;17(15): 1750. <https://doi.org/10.2174/156802661766616111644744>.
529. Wang X, Xu Y, Wang X, Jiang C, Han S, Dong K, et al. LincRNA-p21 suppresses development of human prostate cancer through inhibition of PKM2. *Cell Proliferation*. 2017;50(6): 50.
<https://doi.org/10.1111/CPR.12395>.
530. Yu F, Guo Y, Chen B, Shi L, Dong P, Zhou M, et al. LincRNA-p21 Inhibits the Wnt/ β -Catenin Pathway in Activated Hepatic Stellate Cells via Sponging MicroRNA-17-5p. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41(5): 1970–1980. <https://doi.org/10.1159/000472410>.
531. Wang G, Li Z, Zhao Q, Zhu Y, Zhao C, Li X, et al. LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for human colorectal cancer by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology Reports*. 2014;31(4): 1839–1845. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3047>.
532. Yu F, Lu Z, Chen B, Dong P, Zheng J. Identification of a Novel lincRNA-p21-miR-181b-PTEN Signaling Cascade in Liver Fibrosis. *Mediators of inflammation*. 2016;2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/9856538>.
533. Xu X, Zhuang C, Wu Z, Qiu H, Feng H, Wu J. LincRNA-p21 Inhibits Cell Viability and Promotes Cell Apoptosis in Parkinson's Disease through Activating α -Synuclein Expression. *BioMed Research International*. 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8181374>.
534. Deng K, Wang H, Guo X, Xia J. The cross talk between long, non-coding RNAs and microRNAs in gastric cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2016;48(2): 111–116.
<https://doi.org/10.1093/ABBS/GMV120>.
535. Tang L, Ding J, Zhou G, Liu Z. LncRNA-p21 promotes chondrocyte apoptosis in osteoarthritis by acting as a sponge for miR-451. *Molecular medicine reports*. 2018;18(6): 5295–5301.
<https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9506>.
536. Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, et al. A long noncoding

- RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*. 2011;147(2): 358–369. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.09.028>.
537. Hall JR, Messenger ZJ, Tam HW, Phillips SL, Recio L, Smart RC. Long noncoding RNA lincRNA-p21 is the major mediator of UVB-induced and p53-dependent apoptosis in keratinocytes. *Cell death and disease*. 2015;6(3): e1700. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.67>.
538. Jiang YJ, Bikle DD. LncRNA profiling reveals new mechanism for VDR protection against skin cancer formation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;144 Pt A(PART A): 87–90. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2013.11.018>.
539. Işin M, Uysaler E, Özgür E, Köseoğlu H, Şanlı Ö, Yücel ÖB, et al. Exosomal lincRNA-p21 levels may help to distinguish prostate cancer from benign disease. *Frontiers in Genetics*. 2015;6(MAY). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2015.00168>.
540. Castellano JJ, Marrades RM, Molins L, Viñolas N, Moises J, Canals J, et al. Extracellular vesicle lincRNA-p21 expression in tumor-draining pulmonary vein defines prognosis in NSCLC and modulates endothelial cell behavior. *Cancers*. 2020;12(3). <https://doi.org/10.3390/cancers12030734>.
541. Wang J, Lei ZJ, Guo Y, Wang T, Qin ZY, Xiao HL, et al. miRNA-regulated delivery of lincRNA-p21 suppresses β -catenin signaling and tumorigenicity of colorectal cancer stem cells. *Oncotarget*. 2015;6(35): 37852. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5635>.
542. Castellazzi M, Spyrou G, La Vista N, Dangy JP, Piu F, Yaniv M, et al. Overexpression of c-jun, junB, or junD affects cell growth differently. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(20): 8890–8894. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.20.8890>.
543. Dong Z, Watts RG, Sun Y, Zhan SN, Colburn NH. Progressive elevation of ap-1 activity during preneoplastic-to-neoplastic progression as modeled in mouse jb6 cell variants. *International journal of oncology*. 1995;7(2): 359–364. <https://doi.org/10.3892/IJO.7.2.359>.
544. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. 2012;142(2): 219–232. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.12.001>.
545. Zhai H, Fesler A, Schee K, Fodstad Ø, Flatmark K, Ju J. Clinical significance of long intergenic noncoding RNA-p21 in colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2013;12(4): 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2013.06.003>.
546. Li X, Pu J, Jiang S, Su J, Kong L, Mao B, et al. Henryin, an ent-kaurane Diterpenoid, Inhibits Wnt Signaling through Interference with β -Catenin/TCF4 Interaction in Colorectal Cancer Cells. *PLOS*

- ONE. 2013;8(7): e68525. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0068525>.
547. Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M, Rave-fränk M, Emons G, Gaedcke J, et al. Silencing of the Wnt transcription factor TCF4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis*. 2011;32(12): 1824–1831. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGR222>.
548. Waaler J, Machon O, Von Kries JP, Wilson SR, Lundenes E, Wedlich D, et al. Novel synthetic antagonists of canonical Wnt signaling inhibit colorectal cancer cell growth. *Cancer research*. 2011;71(1): 197–205. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1282>.
549. Li Y, Castellano JJ, Moreno I, Martínez-Rodenas F, Hernandez R, Canals J, et al. LincRNA-p21 Levels Relates to Survival and Post-Operative Radiotherapy Benefit in Rectal Cancer Patients. *Life*. 2020;10(9): 172. <https://doi.org/10.3390/life10090172>.
550. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(34): 8688–8696. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.1329>.
551. Dayde D, Tanaka I, Jain R, Chee Tai M, Taguchi A. Molecular Sciences Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer. *International Journal of Molecular Science*. <https://doi.org/10.3390/ijms18030573>.
552. Zeng WG, Liang JW, Wang Z, Zhang XM, Hu JJ, Hou HR, et al. Clinical parameters predicting pathologic complete response following neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Chinese Journal of Cancer*. 2015;34(10): 41. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0033-7>.
553. Lefevre JH, Mineur L, Kotti S, Rullier E, Rouanet P, De Chaisemartin C, et al. Effect of interval (7 or 11 weeks) between neoadjuvant radiochemotherapy and surgery on complete pathologic response in rectal cancer: A multicenter, randomized, controlled trial (GRECCAR-6). *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(31): 3773–3780. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.6049>.
554. Caramés C, Cristóbal I, Moreno V, del Puerto L, Moreno I, Rodríguez M, et al. MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*. 2015;30(7): 899–906. <https://doi.org/10.1007/s00384-015-2231-9>.
555. Eriksen AHM, Sørensen FB, Andersen RF, Jakobsen A, Hansen TF. Association between the expression of microRNAs and the response of patients with locally advanced rectal cancer to preoperative chemoradiotherapy. *Oncology Letters*. 2017;14(1): 201–209. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6141/HTML>.

556. Kurokawa K, Tanahashi T, Iima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, et al. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *Journal of Gastroenterology*. 2012;47(8): 883–895. <https://doi.org/10.1007/S00535-012-0547-6/TABLES/3>.
557. Hou N, Han J, Li J, Liu Y, Qin Y, Ni L, et al. MicroRNA Profiling in Human Colon Cancer Cells during 5-Fluorouracil-Induced Autophagy. *PLOS ONE*. 2014;9(12): e114779. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114779>.
558. Yu X, Li Z, Yu J, Chan MTV, Wu WKK. MicroRNAs predict and modulate responses to chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Proliferation*. 2015;48(5): 503–510. <https://doi.org/10.1111/CPR.12202>.
559. Wei F, Liu Y, Guo Y, Xiang A, Wang G, Xue X, et al. miR-99b-targeted mTOR induction contributes to irradiation resistance in pancreatic cancer. *Molecular cancer*. 2013;12(1). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-81>.
560. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 2008;132(1): 27–42. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.12.018>.
561. Oshi M, Tokumaru Y, Benesch MG, Sugito N, Wu R, Yan L, et al. High miR-99b expression is associated with cell proliferation and worse patient outcomes in breast cancer. *American journal of cancer research*. 2022;12(10): 4840–4852. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36381329/>
562. Lin T, Yang Y, Ye X, Yao J, Zhou H. Low expression of miR-99b promotes progression of clear cell renal cell carcinoma by up-regulating IGF1R/Akt/mTOR signaling. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2020;13(12): 3083. </pmc/articles/PMC7791382/>
563. Oshi M, Tokumaru Y, Benesch MG, Sugito N, Wu R, Yan L, et al. High miR-99b expression is associated with cell proliferation and worse patient outcomes in breast cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2022;12(10): 4840. </pmc/articles/PMC9641402/>
564. Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Annals of Oncology*. 2011;22(10): 2257–2266. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDQ758>.
565. Liu Y, Xing R, Zhang X, Dong W, Zhang J, Yan Z, et al. miR-375 targets the p53 gene to regulate cellular response to ionizing radiation and etoposide in gastric cancer cells. *DNA Repair*. 2013;12(9): 741–750. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2013.06.002>.
566. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(12): 979–987. <https://doi.org/10.1038/nrd2656>.

567. Viktorsson K, De Petris L, Lewensohn R. The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. p. 868–880. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.192>.
568. Shen Y, Wang P, Li Y, Ye F, Wang F, Wan X, et al. miR-375 is upregulated in acquired paclitaxel resistance in cervical cancer. *British Journal of Cancer* 2013 109:1. 2013;109(1): 92–99. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.308>.
569. Mussnich P, Rosa R, Bianco R, Fusco A, D'Angelo D. MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1. 2015;19(8): 1017–1026. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1057569>.
570. Arvidsson Y, Rehammar A, Bergström A, Andersson E, Altiparmak G, Swärd C, et al. miRNA profiling of small intestinal neuroendocrine tumors defines novel molecular subtypes and identifies miR-375 as a biomarker of patient survival. *Modern Pathology*. 2018;31(8): 1302–1317. <https://doi.org/10.1038/S41379-018-0010-1>.
571. Yang X, Nanayakkara J, Claypool D, Saghafinia S, Wong JJM, Xu M, et al. A miR-375/YAP axis regulates neuroendocrine differentiation and tumorigenesis in lung carcinoid cells. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 10455. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-89855-4>.
572. Conde-Muiño R, Cano C, Sánchez-Martín V, Herrera A, Comino A, Medina PP, et al. Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer: the sensitizer role of the association between miR-375 and c-Myc. *Oncotarget*. 2017;8(47): 82294–82302. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19393>.
573. Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Current oncology*. 2010;17(1): 70–80. <https://doi.org/10.3747/CO.V17I1.356>.
574. Zhao Y, Deng C, Wang J, Xiao J, Gatalica Z, Recker RR, et al. Let-7 family miRNAs regulate estrogen receptor alpha signaling in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2011;127(1): 69–80. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0972-2>.
575. Oztemur Islakoglu Y, Noyan S, Aydos A, Gur Dedeoglu B. Meta-microRNA Biomarker Signatures to Classify Breast Cancer Subtypes. *Omics : a journal of integrative biology*. 2018;22(11): 709–716. <https://doi.org/10.1089/OMI.2018.0157>.
576. Viñas JL, Ventayol M, Brüne B, Jung M, Sola A, Pi F, et al. miRNA let-7e modulates the Wnt pathway and early nephrogenic markers in mouse embryonic stem cell differentiation. *PloS one*. 2013;8(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060937>.
577. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Barnes C, Dworkin AM, Weller C, et al. Differential

- microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Human mutation*. 2012;33(3): 551–560. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22021>.
578. Arora S, Ranade AR, Tran NL, Nasser S, Sridhar S, Korn RL, et al. MicroRNA-328 is associated with (non-small) cell lung cancer (NSCLC) brain metastasis and mediates NSCLC migration. *International journal of cancer*. 2011;129(11): 2621–2631. <https://doi.org/10.1002/IJC.25939>.
579. Ji Y, You Y, Wu Y, Wang M, He Q, Zhou X, et al. Overexpression of miR-328-5p influences cell growth and migration to promote NSCLC progression by targeting LOXL4. *Annals of Translational Medicine*. 2022;10(6): 301–301. <https://doi.org/10.21037/ATM-22-345>.
580. Panarelli N, Tyryshkin K, Mun Wong JJ, Majewski A, Yang X, Scognamiglio T, et al. Evaluating gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors through microRNA sequencing. *Endocrine-related cancer*. 2019;26(1): 47–57. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0244>.
581. Liu C, Zhang L, Huang Y, Lu K, Tao T, Chen S, et al. MicroRNA-328 directly targets p21-activated protein kinase 6 inhibiting prostate cancer proliferation and enhancing docetaxel sensitivity. *Molecular medicine reports*. 2015;12(5): 7389–7395. <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.4390>.
582. Li JR, Wang JQ, Gong Q, Fang RH, Guo YL. MicroRNA-328 inhibits proliferation of human melanoma cells by targeting TGF β 2. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(4): 1575–1579. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.4.1575>.
583. Delic S, Lottmann N, Stelzl A, Liesenberg F, Wolter M, Götze S, et al. MiR-328 promotes glioma cell invasion via SFRP1-dependent Wnt-signaling activation. *Neuro-Oncology*. 2014;16(2): 179. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOT164>.
584. Liang F, Cui ZJ, Liu JD, Liu KP, Li L, Chen YL. Downregulated miR-328 suppressed cell invasion and growth in hepatocellular carcinoma via targeting PTEN. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2018;22(19): 6324–6332. https://doi.org/10.26355/EURREV_201810_16043.
585. Pan S, Ren F, Li L, Liu D, Li Y, Wang A, et al. MiR-328-3p inhibits cell proliferation and metastasis in colorectal cancer by targeting Girdin and inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway. *Experimental cell research*. 2020;390(1). <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2020.111939>.
586. Zhou C, Liu H shan, Wang F wei, Hu T, Liang Z xing, Lan N, et al. circCAMSAP1 Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer via the miR-328-5p/E2F1 Axis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2020;28(3): 914–928.

<https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2019.12.008>.

587. Della Vittoria Scarpati G, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, et al. A Specific miRNA Signature Correlates With Complete Pathological Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2012;83(4): 1113–1119. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.09.030>.
588. Wang G, Li Z, Zhao Q, Zhu Y, Zhao C, Li X, et al. LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for human colorectal cancer by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology Reports*. 2014;31(4): 1839–1845. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3047>.
589. Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. 2010;142(3): 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.040>.
590. Lee H, Kim C, Ku JL, Kim W, Yoon SK im, Kuh HJ, et al. A long non-coding RNA snaR contributes to 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *Molecules and cells*. 2014;37(7): 540–546. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0151>.
591. Zhou Q, Zhan H, Lin F, Liu Y, Yang K, Gao Q, et al. LincRNA-p21 suppresses glutamine catabolism and bladder cancer cell growth through inhibiting glutaminase expression. *Bioscience Reports*. 2019;29(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20182372>.
592. Ning Y, Yong F, Haibin Z, Hui S, Nan Z, Guangshun Y. LincRNA-p21 activates endoplasmic reticulum stress and inhibits hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(29): 28151–28163. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4661>.