ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Alba
Turégano Hernández

Tesis doctoral

Análisis multiómicos para la investigación y desarrollo de técnicas diagnósticas en adenocarcinoma de pulmón y colorrectal

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Medicina Molecular

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL (EDIUS)

TESIS DE DOCTORADO

Análisis multiómicos para la investigación y desarrollo de técnicas diagnósticas en adenocarcinoma de pulmón y colorrectal

Alba Turégano Hernández

Escuela de doctorado internacional

Programa de doctorado en Medicina Molecular

Santiago de Compostela

2023

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Declaración del autor/a de la tesis:

Don/Doña: Alba Turégano Hernández

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento acorde al reglamento y declaro que:

1. La tesis recoge los resultados obtenidos a través de la realización de mi trabajo.
2. Siendo el caso, se hace referencia en la tesis a las colaboraciones que tuvieron lugar durante el desarrollo de esta.
3. Este documento representa la versión definitiva de la tesis presentada para su defensa y coincide con la versión electrónica enviada.
4. Confirmo que esta tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de otros trabajos presentados por mi para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela a de de 2023.

Fdo. Alba Turégano Hernández

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Autorización del director/tutor de la tesis

Análisis multiómicos para la investigación y desarrollo de técnicas diagnósticas en adenocarcinoma de pulmón y colorrectal

Dr. Rafael López López

Dr. Luis León Mateos

INFORMAN:

Que la presente tesis se corresponde con el trabajo realizado por Doña Alba Turégano Hernández bajo nuestra dirección, que cumple con los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC y que, como directores de esta, no incurrimos en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2025, por lo que autorizamos su presentación.

En Santiago de Compostela a de de 2023

Fdo. Rafael López López *Fdo. Luis León Mateos*

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Conflicto de interés

Análisis multiómicos para la investigación y desarrollo de técnicas diagnósticas en adenocarcinoma de pulmón y colorrectal

Doña. Alba Turégano Hernández

Declaro no tener ningún tipo de conflicto de intereses, ni ninguna relación económica, personal, política, interés financiero ni académico que pueda influir en este trabajo.

En Santiago de Compostela a de de 2023

Fdo. Alba Turégano Hernández

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Esta tesis, así como los trabajos derivados de la misma se han realizado en el Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (Idis) así como en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela dentro del proyecto “Multi-Omics data for Cancer Research and the Developement of New Diagnostics and Therapies” (TITANIA). La financiación ha sido proporcionada por la compañía privada Indivumed,que tiene su dirección legal en Falkenried 88, 20251 Hamburg, Alemania y cuyo CEO es el Dr. Hartmunt Juhl.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

“La enfermería es un arte progresivo, en el cual permanecer inactivo es haber fracasado”

Florence Nightingale

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos:

GRACIAS a los pacientes y familiares. El altruismo y la generosidad que han demostrado en la vulnerabilidad que supone la enfermedad en pro de un beneficio colectivo es la mayor clase de humanidad a la que jamás he asistido.

Igualmente, este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo y la colaboración de todo el personal que forma parte de los servicios de Oncología Médica, Cirugía Torácica, Cirugía Digestiva y Anatomía Patológica que con tanta ilusión ha colaborado en que este proyecto llegase a buen puerto. A todos vosotros mi más sincero agradecimiento.

Gracias a mis directores, el Dr. Rafael López López y el Dr. Luis León Mateos, no solo por la confianza para desarrollar este proyecto, sino por el tiempo que han dedicado acompañándome y guiándome en la realización de este trabajo, por sus consejos, y en definitiva por haberme dejado aprender tanto de ellos.

Del mismo modo, este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración de mis compañeros de la Unidad de Ensayos Clínicos de Oncología. Ellos han trabajo conmigo codo con codo durante todos estos años, ayudándome con entusiasmo en el desarrollo de este proyecto. Gracias a todos por haberme acompañado en esta etapa académica tan importante de mi vida, con especial cariño a las doctoras García Rubín, Cerqueiro Rey, Portos Conde y Santana Martínez, por ser mucho más que compañeras.

A Cristina y a Lorena les debo gran parte del éxito de este trabajo. En este punto de nuestra historia, tras más de 15 años de amistad, todas las palabras se quedan cortas. Gracias por devolverme a casa siempre que ha sido necesario.

A Leo, que ha recorrido este camino conmigo de la mano, gracias por haber mantenido la fe, la razón, la esperanza y la calma en los momentos en los que a mí me ha faltado. Gracias por creer en este proyecto incluso antes de que existiese. Somos un gran equipo.

Por último y más importante gracias a mis padres, sin vosotros nada de esto hubiese sido posible. Vuestro ejemplo de sacrificio lucha y constancia es la mejor enseñanza que me habéis regalado. Gracias por acompañarme con amor y respeto en todas las decisiones que he tomado en mi vida, gracias por ser las alas desde donde volar y los brazos a los que volver.

USC DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice

Índice de abreviaturas **7**

Resumen **13**

Capítulo 1: Introducción **19**

1. Introducción general **19**

1.1. ¿Qué es el cáncer? Una breve aproximación ***19***

1.2. Epidemiología ***20***

1.3. Factores de riesgo ***22***

1.4. Prevención y detección precoz ***24***

1.5. Transformación de la célula epitelial en adenocarcinoma ***27***

2. Diagnóstico y estadificación: de las técnicas clásicas a la medicina de precisión **34**

2.1. Anatomía e histología: adenocarcinoma de pulmón ***34***

2.2. Test diagnósticos en adenocarcinoma de pulmón ***37***

2.3. Estadificación del adenocarcinoma de pulmón ***40***

2.4. Nuevas técnicas para el diagnóstico del adenocarcinoma de pulmón ***42***

2.5. Anatomía e histología: adenocarcinoma colorrectal ***48***

2.6. Test diagnósticos en adenocarcinoma colorrectal ***50***

2.7. Estadificación del adenocarcinoma colorrectal ***52***

2.8. Nuevas técnicas para el diagnóstico del adenocarcinoma colorrectal ***54***

3. Tratamiento **58**

3.1. Tratamiento del adenocarcinoma de pulmón ***58***

3.1.1. Vigilancia activa *60*

3.1.2. Cirugía *61*

3.1.3. Radioterapia *64*

3.1.4. Tratamiento sistémico: quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida *69*

3.1.5. Evaluación de la respuesta tumoral. Criterios de seguimiento de la progresión y resistencia farmacológica a través de técnicas multiómicas *79*

3.2. Tratamiento del adenocarcinoma colorrectal ***85***

3.2.1. Vigilancia activa *88*

3.2.2. Cirugía *90*

3.2.3. Radioterapia *94*

3.2.4. Tratamiento sistémico: quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida *97*

3.2.5. Evaluación de la respuesta tumoral. Criterios de seguimiento de la progresión y resistencia farmacológica a través de técnicas multiómicas *104*

Capítulo 2: Hipótesis y objetivos **113**

Capítulo 3: Material y métodos **117**

1. Diseño del estudio **117**

2. Criterios de elegibilidad de pacientes **118**

3. Obtención de la base de datos clínicos del paciente **118**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Obtención y análisis de las muestras de sangre 119

5. Obtención y análisis de las muestras de tejido 123

5.1. Purificación de DNA para Secuenciación de Genoma completo (WGS) 126

5.2. Purificación de RNA para transcriptómica 130

5.3. Purificación de proteínas para análisis proteómicos/fosfoproteómicos 130

5.4. Análisis mutacionales analizados sobre el tejido en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela 132

6. Establecimiento de un circuito de trabajo en el hospital para la obtención y análisis de las muestras de sangre, muestras de tejido y datos clínicos de los pacientes 135

7. Análisis estadístico 137

8. Aspectos éticos y legales 138

Capítulo 4: Resultados 141

4.2. Resultados referentes a la obtención y procesamiento de las muestras de sangre y tejido 150

4.3. Variaciones genómicas obtenidas de la WGS 153

4.3.1. Variaciones somáticas 153

4.3.2. Variaciones germinales 160

4.3.3. Firmas mutacionales basadas en las variaciones somáticas obtenidas a partir de WGS 160

4.4. Marcadores de inmunoterapia 166

4.4.1. Marcadores inmunitarios: Carga mutacional tumoral (TMB) 166

4.4.2. Marcadores inmunitarios: Inestabilidad de microsatélites 169

4.4.3. Marcadores inmunitarios: Puntos de control inmunitario 170

4.5. Proteínas reguladas diferencialmente a partir de dianas farmacológicas conocidas 174

4.5.1. Fosforilaciones dentro de las proteínas con mayor expresión 178

4.6. Resultados de los análisis mutacionales analizados sobre el tejido en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela 182

4.7. Análisis de la supervivencia libre de progresión y supervivencia global a los dos años 183

Capítulo 5: Discusión 187

Capítulo 6: Conclusiones 211

Bibliografía 215

Anexos 245

ANEXO 1: Plantilla de recogida de datos 245

ANEXO 2: Carta de invitación al paciente para participar en el estudio 267

ANEXO 3: Circuito de trabajo para el desarrollo del proyecto en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. 268

ANEXO 4: Hoja de información para el paciente y Consentimiento Informado 269

ANEXO 5: Aprobación del Comité de Ética 276

ANEXO 6: Firmas mutacionales 279

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de la incidencia y la mortalidad entre los 10 principales cánceres a nivel global en 2020 para ambos sexos. Fuente: Globocan 2020 21

Figura 2. Histología de tejido tumoral y sano de pulmón y de colon: A) Adenocarcinoma de colon (glándulas neoplásicas infiltrando la lámina muscular propia), HE, x10. B) Mucosa normal del colon (tejido sano), HE, x10. C) Adenocarcinoma de pulmón (tipo acinar), HE, x10. D) Tejido alveolar pulmonar normal (tejido sano), HE, x10 28

Figura 3. Proceso de migración celular de célula epitelial a mesenquimal: A) célula epitelial de colon, B) célula mesenquimal de colon 30

Figura 4. Proceso de transición EMT 33

Figura 5. Anatomía del pulmón 35

Figura 6. Imagen de adenocarcinoma de pulmón obtenida por A) CT vs B) PET-CT 39

Figura 7. Anatomía del colon 49

Figura 8 Diseño del estudio 117

Figura 9. Componentes sanguíneos 120

Figura 10. Escala colorimétrica de hemólisis en suero sanguíneo humano 121

Figura 11. Protocolo de extracción de suero y PBMC a partir de sangre completa 123

Figura 12. Patrón para la disección del tejido 124

Figura 13. Protocolo de obtención de las muestras de tejido 125

Figura 14. Contribución mutacional del paciente 5C1 a las firmas mutacionales 161

Figura 15. Contribución mutacional del paciente 5C4 a las firmas mutacionales 163

Figura 16. Contribución mutacional del paciente 5C7 a las firmas mutacionales 164

Figura 17. Contribución mutacional del paciente 5C9 a las firmas mutacionales 164

Figura 18. Contribución mutacional del paciente 5C14 a las firmas mutacionales 165

Figura 19. Contribución mutacional del paciente 5C15 a las firmas mutacionales 166

Figura 20. TMB de los pacientes con adenocarcinoma de CRC 167

Figura 21. TMB de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón 168

Figura 22. Estatus de MSI en pacientes con adenocarcinoma de CRC 169

Figura 23. Estatus de MSI en pacientes con adenocarcinoma de pulmón 170

Figura 24. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C1 171

Figura 25. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C4 172

Figura 26. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C7 172

Figura 27. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C9 173

USC DE COMPOSTELA

Figura 28. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C14 173
Figura 29. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C1 174
Figura 30. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C2 175
Figura 31. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C4 175
Figura 32. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C7 176
Figura 33. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C9 177
Figura 34. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C14 177
Figura 35. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C15 178
Figura 36. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C1 179
Figura 37. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C2 180
Figura 38. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C4 180
Figura 39. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C9 181
Figura 40. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C14 ... 181
Figura 41. Supervivencia libre de progresión (SLP) de todos los participantes a lo largo de los distintos seguimientos 183
Figura 42. Supervivencia global (SG) de todos los participantes a lo largo de los distintos seguimientos 184

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de tablas

Tabla 1. Estadificación TNM del cáncer de pulmón. Adaptado de la guía de la AJCC 8ª edición (versión de 2018)..... 41

Tabla 2. Estadificación TNM del cáncer de colorrectal. Adaptado de la guía de la AJCC 8ª edición (versión de 2018)..... 53

Tabla 3. Clasificación de los fármacos inmunoterápicos para el cáncer de pulmón según su diana terapéutica..... 60

Tabla 4. Ensayos clínicos en curso con inhibidores de punto de control inmunitario en neoadyuvancia con o sin quimioterapia 70

Tabla 5. Ensayos clínicos en curso con inhibidores de punto de control inmunitario con o sin quimioterapia en tumores de pulmón en estadio avanzado 75

Tabla 6. Principales ensayos clínicos de radioterapia de larga y corta duración con quimioterapia e inmunoterapia. 96

Tabla 7. Ensayos clínicos en desarrollo para la evaluación de posibles sinergias entre dianas terapéuticas en CRC 104

Tabla 8. Principales mecanismos de resistencia a las terapias dirigidas en CRC, estrategias para superarlos y principales fármacos en desarrollo por diana terapéutica 110

Tabla 9. Criterios de elegibilidad 118

Tabla 10. Proceso estandarizado de realización de la muestra de tumor FFPE..... 125

Tabla 11. Listado de genes seleccionado para NGS..... 127

Tabla 12. Distribución de la cohorte control por paciente..... 128

Tabla 13. Panel de genes hereditarios seleccionados para NGS 129

Tabla 14. Genes y tipos de variantes incluidas en el panel de NGS empleado en el CHUS para adenocarcinoma de pulmón..... 134

Tabla 15. Datos clínicos relativos a la fase prequirúrgica de los pacientes con adenocarcinoma de CRC..... 142

Tabla 16. Datos clínicos relativos a la fase prequirúrgica de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón..... 144

Tabla 17. Datos clínicos relativos al seguimiento post-cirugía dentro de la fase postquirúrgica 146

Tabla 18. Datos clínicos relativos al seguimiento de 6 meses post-cirugía dentro de la fase postquirúrgica..... 148

Tabla 19. Datos clínicos relativos al seguimiento de 1 año post-cirugía dentro de la fase postquirúrgica..... 149

Tabla 20. Datos clínicos relativos al seguimiento de 2 años post-cirugía dentro de la fase postquirúrgica..... 150

Tabla 21. Datos relativos a la obtención y procesamiento de las muestras de sangre pre-cirugía 151

Tabla 22. Datos relativos a la obtención y procesamiento de las muestras de tejido 152

Tabla 23. Cobertura de la secuenciación WGS..... 153

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Tabla 24. Mutaciones somáticas registradas por paciente..... 154
Tabla 25. Amplificaciones y deleciones en genes somáticos detectadas por paciente..... 159
Tabla 26. Cobertura de la RNA-seq por paciente..... 171
Tabla 27. Cobertura del análisis del proteoma por paciente..... 174
Tabla 28. Cobertura del análisis del fosfoproteoma por paciente 178

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de abreviaturas

3D-CRT	Radioterapia tridimensional conformada
18FDG-PET	Tomografía por emisión de positrones con flúor-18-fluorodeoxiglucosa
AJCC	Comité conjunto americano del cáncer
ALK	Gen del receptor de la tirosina quinasa del linfoma anaplásico
APC	gen de la poliposis adenomatosa coli
ASCO	Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica
A.T	Adenina-timina
AUC	Área bajo la curva
BAL	Citología de lavado broncoalveolar
BMI	Índice de masa corporal
BRAF	Protooncogén BRAF
CA125	Antígeno del cáncer 125
CA19.9	Antígeno del cáncer 19.9
cCR	Respuesta clínica completa
CCRT	Quimiorradioterapia concurrente
CEA	Antígeno carcinoembrionario
cfDNA	DNA libre circulante
C.G	Citosina-Guanina
CHUS	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela
CI	Consentimiento informado
CO_2	Dióxido de carbono
COPD	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CRC	Cáncer colorrectal
CT	Tomografía computarizada
CTC	Célula tumoral circulante
CTCAE	Criterios de terminología común para eventos adversos
CT-CAP	Tomografía computarizada de tórax abdomen y pelvis
ctDNA	DNA tumoral circulante
CTLA-4	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos
CYFRA 21-1	Fragmento de citoqueratina 21-1
DM2	Diabetes mellitus tipo II
dMMR	Deficiencia del sistema de reparación de errores de emparejamiento del DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	Solución salina tamponada con fosfato
EBRT	Radioterapia de haz externo
EBUS	Ultrasonografía endobronquial
EECC	Ensayo/s clínico/os
EE.UU.	Estados Unidos
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EMT	Transición epitelio-mesenquimal celular

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EORTC	Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica
EUS	Ultrasonografía endoscópica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FGFR	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
Gy	Gray
HE	Tinción de hematoxilina-eosina
HER2	Factor de crecimiento epidérmico humano Receptor-tipo2
HR	Cociente de riesgo
IANUS	Historia clínica electrónica en atención especializada
IC	Intervalo de confianza
ICH	Conferencia internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano
IMRT	Radioterapia de intensidad modulada
INDEL	Inserción o deleción
IPA	Índice paquetes-año
iRECIST	Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos tratados con inmunoterapia
Ki67	Antígeno marcador celular de proliferación
KRAS	Oncogén homólogo al virus Kristen del sarcoma de rata
LAG-3	Gen 3 de activación de linfocitos
MALDI-TOF	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz
MET	MET proto-oncogén
MHC-1	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MRI	Resonancia magnética nuclear
MSI-H	Inestabilidad de microsatélites
MSS	Estabilidad de microsatélites
NCCN	Red Nacional Integral del Cáncer
NGS	Secuenciación de nueva generación
NKG2A	Receptor de células asesinas naturales
NSAID	Antiinflamatorio no esteroideo
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
NTRK	Receptor neurotrófico tirosina quinasa
O_2	Oxígeno
PAAF	Punción-aspiración con aguja fina
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
pCR	Respuesta patológica completa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada celular
PET-CT	Tomografía por emisión de positrones
PI3K	Fosfoinositida 3-quinasa
pMMR	Reparación competente del sistema de reparación de errores de emparejamiento del DNA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PS	Estado de rendimiento
QT	Quimioterapia
Qx	Cirugía
R0	Resección quirúrgica completa
RAF	Protooncogén serina/treonina-proteína quinasa
RAS	Protooncogén RAS
RATS	Cirugía torácica asistida por robot
RD	Real decreto
RECIST	Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos
RET	Protooncogén RET
RMI	Espectroscopía de resonancia magnética de imagen
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación de ácido ribonucleico
RT	Radioterapia
SBRT	Radiocirugía estereotáctica
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
SNV	Variación de un solo nucleótido en la secuencia de DNA
SuvMax	Valor de captación estandarizado máximo
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIGIT	Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumor
TKI	Tirosina quinasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
TNM	Sistema de medición Tumor-Nódulo-Metástasis
TMB	Carga mutacional tumoral
P53	Gen supresor de tumores P53
PFS	Supervivencia libre de progresión
TPA	Antígeno polipeptídico tisular
TTF-1	Factor de transcripción tiroidea 1
TYMS	Timidato sintetasa
UBE	Unidad de bebida estándar
UE	Unión Europea
VATS	Cirugía toracoscópica mínimamente invasiva asistida por video
VCF	Formato de llamado de variantes
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VS	Versus
WGS	Secuenciación de genoma completo
WHO	Organización Mundial de la Salud

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resumen

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resumen

Antecedentes: El adenocarcinoma de pulmón y el adenocarcinoma colorrectal, son sin hacer distinción de sexo los dos tipos de tumores que representan una mayor incidencia y prevalencia en occidente. Aunque los programas de cribado establecidos en los últimos años han ayudado a mejorar la detección y seguimiento de la enfermedad,ambas patologías continúan presentado una tasa de recurrencia a los 5 años de hasta el 50% suponiendo un 25% y un 12% de los decesos totales por cáncer.

Las técnicas multiómicas, han demostrado una alta capacidad para realizar análisis profundos sobre el desarrollo y comportamiento tumoral en comparación con las técnicas clásicas. Este hecho, ha supuesto un cambio de paradigma hacia un enfoque multiparamétrico que aporta una mejor comprensión de la carcinogénesis y la heterogeneidad tumoral de cada paciente, por lo que el desarrollo y perfeccionamiento de estas técnicas será altamente beneficioso para la consecución de un diagnóstico, tratamiento y pronóstico certero e individualizado.

En este estudio, se evaluó la capacidad de las técnicas multiómicas para proporcionar un análisis más completo y exhaustivo de las bases moleculares de los adenocarcinomas de pulmón y de los adenocarcinomas colorrectales, así como para favorecer la predicción de la evolución y pronóstico de los mismos en pacientes previamente no tratados sometidos a cirugía radical.

Material y métodos: se reclutaron 14 pacientes de los cuales solamente se pudieron llevar a cabo los análisis multiómicos sobre 7. Muestras de tejido fresco y parafinado de 3 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma colorrectal (CRC) y de 4 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón fueron obtenidas y sobre ellas se analizó la expresión génica mediante WGS, la expresión del transcriptoma mediante RNA-seq y la expresión del proteoma mediante MALDI-TOF. Como control se utilizó tejido sano adyacente al tumoral. Así mismo, se recogieron datos clínicos del paciente y se obtuvieron muestras de sangre periférica en 5 tiempos diferentes para la realización del seguimiento de la enfermedad.

Resultados: los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de CRC presentaron las siguientes características comunes: carga mutacional baja, estabilidad de microsatélites, ausencia de marcadores de punto de control inmunitario, ausencia de mutaciones conductoras y sobreexpresión de las proteínas MKI67, TOP1 y alguna de las variables

USC DE COMPOSTELA

pertenecientes a las familias POLD, POLE y NDUFA. Por su parte, los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón presentaron las siguientes similitudes: mutación conductora (considerando las amplificaciones) en *KRAS*, y estabilidad de microsatélites. Por el contrario, no se identificaron ni proteínas ni marcadores de punto de control inmunitario comunes.

Comparando los perfiles de ambos grupos, se identificó como más prevalente la sobreexpresión de proteínas de las familias POLD, POLE, NDUFA, TOP y MET.

En lo que respecta a la supervivencia, se obtuvo un 85,7% de supervivencia libre de progresión y un 100% de supervivencia global a los 2 años tras la cirugía radical.

Conclusiones: En este estudio, se ha demostrado en todos los participantes que el análisis multimodo de los tumores proporciona una mayor información sobre el comportamiento y evolución de estos, así como permite detectar marcadores potenciales de eficacia y resistencia a los distintos tratamientos. Este hecho, ha permitido consecuentemente establecer un pronóstico más certero en comparación con los datos obtenidos por práctica clínica habitual poniendo de manifiesto que el desarrollo de las técnicas multiómicas es una pieza clave en la consecución e implantación de la medicina de precisión en nuestros hospitales.

Palabras clave: adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma colorrectal, técnicas multiómicas, medicina de precisión.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumo

Antecedentes: O adenocarcinoma de pulmón e o adenocarcinoma colorrectal, son sen facer distinción de sexo os dous tipos de tumores que representan unha maior incidencia e prevalencia en occidente. Aínda que os programas de cribado establecidos nos últimos anos axudaron a mellorar a detección e seguimento da enfermidade, ambas patoloxías continúan presentando unha taxa de recorrencia aos 5 anos de ata o 50% supoñendo un 25% e un 12% dos finados totais por cancro.

As técnicas multiómicas, demostraron unha alta capacidade para realizar análises profundas sobre o desenvolvemento e comportamento tumoral en comparación coas técnicas clásicas. Este feito, supuxo un cambio de paradigma cara un enfoque multiparamétrico que achega unha mellor comprensión da carcinoxénesis e da heteroxeneidade tumoral de cada paciente, polo que o desenvolvemento e perfeccionamento destas técnicas será altamente beneficioso para a consecución dun diagnóstico, tratamento e prognóstico certeiro e individualizado.

Neste estudo, avaliouse a capacidade das técnicas multiómicas para proporcionar unha análise máis completa e exhaustivo das bases moleculares dos adenocarcinomas de pulmón e dos adenocarcinomas colorrectais, así como para favorecer a predición da evolución e prognóstico dos mesmos en pacientes previamente non tratados sometidos a cirurxía radical

Material e métodos: recrutáronse 14 pacientes dos cales soamente se puideron levar a cabo as análises multiómicas sobre 7. Mostras de tecido fresco e parafinado de 3pacientes diagnosticados con adenocarcinoma colorrectal (CRC) e de 4 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón foron obtidas e sobre elas analizouse a expresión xénica mediante WGS, a expresión do transcriptoma mediante RNA-seq e a expresión do proteoma mediante MALDI-TOF. Como control utilizouse tecido san adxacente ao tumoral. Así mesmo, recolléronse datos clínicos do paciente e obtivéronse mostras de sangue periférico en 5 tempos diferentes para a realización do seguimento daenfermidade.

Resultados: os pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de CRC presentaron as seguintes características comúns: carga mutacional baixa, estabilidade de microsatélites, ausencia de marcadores de punto de control inmunitario, ausencia de mutacións condutoras e sobreexpresión das proteínas MKI67, TOP1 e algunha das variables

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pertencentes ás familias POLD, POLE e NDUFA. Pola súa banda, os pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón presentaron as seguintes similitudes: mutación condutora (considerando as amplificacións) en *KRAS*, e estabilidade de microsatélites. Pola contra, non se identificaron nin proteínas nin marcadores de punto de control inmunitario comúns.

Comparando os perfís de ambos os grupos, identificouse como máis común a sobreexpresión de proteínas das familias POLD, POLE, NDUFA, TOP e MET.

No que respecta á supervivencia, obtívose un 85,7% de supervivencia libre de progresión e un 100% de supervivencia global aos 2 anos tras a cirurxía radical.

Conclusións: Neste estudo, demostrouse en todos os participantes que a análise multiómica dos tumores proporciona unha maior información sobre o comportamento e evolución destes, así como permite detectar marcadores potenciais de eficacia e resistencia aos distintos tratamentos. Este feito permitiu consecuentemente establecer un prognóstico máis certeiro en comparación cos datos obtidos por práctica clínica habitual poñendo de manifesto que o desenvolvemento das técnicas multiómicas é unha peza clave na consecución e implantación da medicina de precisión nos nosos hospitais.

Palabras chave: adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma colorrectal, técnicas multiómicas, medicina de precisión.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Introducción

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 1: Introducción

1. Introducción general

1.1. ¿Qué es el cáncer? Una breve aproximación

El cáncer (neoplasia o tumor maligno), es un término empleado para designar al conjunto de enfermedades que se originan en los órganos y tejidos del cuerpo cuando células anormales comienzan a multiplicarse de forma descontrolada pudiendo llegar a sobrepasar sus límites anatómicos habituales, propagándose por áreas adyacentes o incluso por otros órganos (metástasis). (1)

Las causas del crecimiento irregular y descontrolado de dichas células son aún un desafío para la comunidad científica, aunque en los últimos años, las técnicas modernas de análisis han permitido desentrañar algunas de las vías de señalización celular cuya alteración es precursora de la formación, desarrollo y expansión de las células cancerígenas.

La función principal de las vías de señalización celular es procurar la comunicación entre estas mediante el envío, interpretación y recepción de señales del medio que regulan su crecimiento, división o muerte entre otros, en base a las necesidades del organismo.

Estas vías de señalización se activan o inhiben principalmente por la interacción de productos derivados de la expresión de protooncogenes y genes supresores de tumores. Ocasionalmente, cuando alguno de estos protooncogenes o genes supresores de tumores sufren modificaciones de distinta índole (genéticas, epigenéticas, etc.) generanproductos derivados defectuosos, que darán lugar a una incorrecta activación de las vías de señalización celular y por consiguiente a un comportamiento celular aberrante. (2)

La aparición de estos eventos es irregular y poco previsible, por lo que conocer las causas y modificaciones concretas que se producen sobre los genes y los productos derivados de su expresión nos permitirá conocer y abordar con mayor eficiencia el diagnóstico temprano, así como el tratamiento del cáncer.

El cuerpo de un ser humano adulto se compone de aproximadamente 30 trillones de células agrupadas en unas 200 categorías histológicas diferentes siendo en su mayoría potencialmente cancerígenas. (3) Analizar las vías de señalización de todas estas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

categorías en un solo trabajo se convierte en una tarea imposible, por lo que este manuscrito se limitará a hablar del cáncer de pulmón y del cáncer de colon, concretamente del subtipo adenocarcinoma, es decir, de los tumores sólidos que se generan en el tejido glandular (en las células epiteliales que producen y liberan moco). (4)

1.2. Epidemiología

El cáncer, es la principal causa de morbimortalidad alrededor del mundo, convirtiéndose por ende en la primera barrera para el aumento de la esperanza de vida a nivel global, especialmente en la población mayor de 70 años. (5)

Atendiendo a los más recientes informes sobre la incidencia de esta enfermedad, a nivel global se produjeron en el año 2020 aproximadamente 19 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes. Estos nuevos casos se registraron principalmente en Asia y en Europa con un 58% y 23% respectivamente, seguidos de América con un 20% y África con un 7%. Los índices de mortalidad sugieren la misma tendencia. Teniendo en cuenta que la población de Asia representa un 59% de la población global, la de Europa un 9,7%, la de América y África un 30% podemos inferir que el cáncer es una enfermedad prevalente en países desarrollados cuya población está envejecida. (5)

Sin hacer distinción de sexo, el cáncer de pulmón es el de mayor incidencia, representando el 11% de los nuevos diagnósticos y el 18% de los fallecimientos. Inmediatamente después, es seguido por el cáncer colorrectal, al que se achacan un 10% de los nuevos diagnósticos y un 9,4% del total de muertes a nivel mundial. En ambos casos, el subtipo patológico predominante es el adenocarcinoma, representando alrededor del 38% de los casos de pulmón y el 95% de los casos de cáncer colorrectal (ver Figura 1). (5, 6,7)

Si diferenciamos por sexos, en el caso de los hombres veremos que el cáncer de pulmón es responsable de la mayor tasa de incidencia y mortalidad quedando en tercer lugar el colorrectal inmediatamente después del cáncer de próstata. En el caso de las mujeres, el cáncer colorrectal tomará mayor relevancia que el cáncer de pulmón, siendo el segundo en incidencia y tercero en mortalidad justo por detrás del cáncer de mama, quedando el cáncer de pulmón en tercera posición en lo que respecta a incidencia y en segunda posición en mortalidad. (5)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

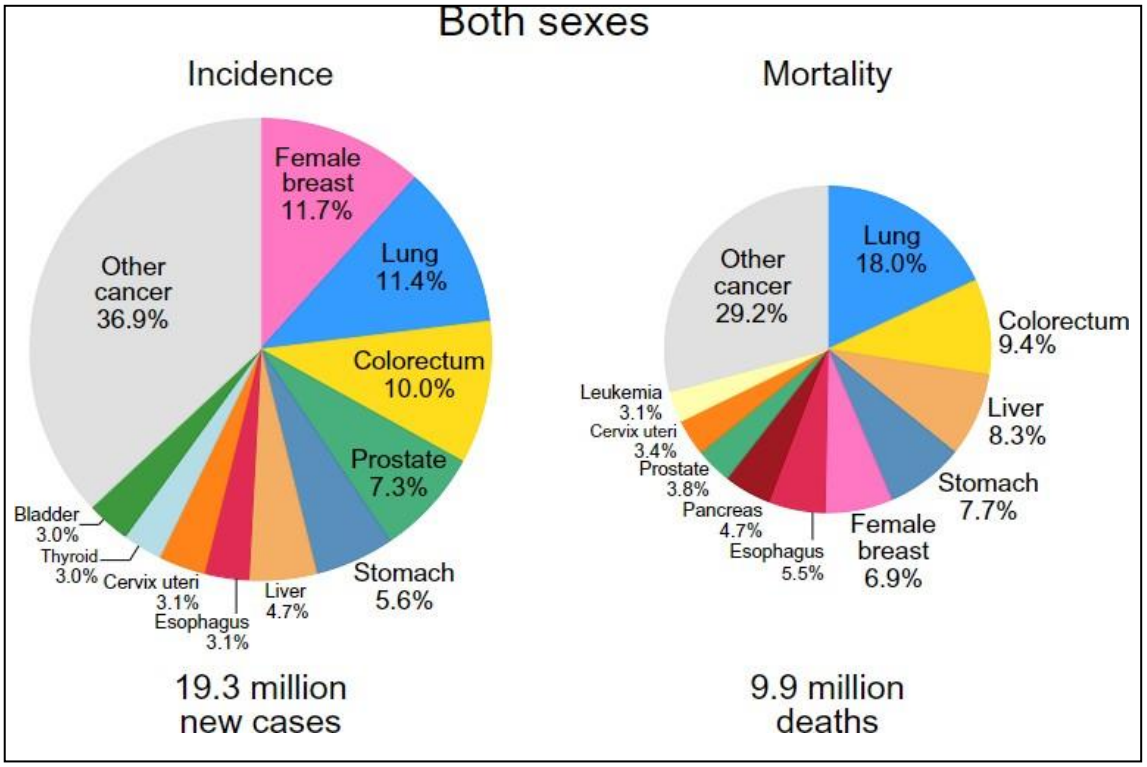


Figura 1. Distribución de la incidencia y la mortalidad entre los 10 principales cánceres a nivel global en 2020 para ambos sexos. Fuente: Globocan 2020

Estos datos, son extrapolables a Europa, donde el cáncer de pulmón representa aproximadamente un 15% de la incidencia y un 25% de los fallecimientos, seguido del cáncer colorrectal que representa un 13% de la incidencia y un 12% de los decesos. (8) España, no difiere de las estadísticas europeas, habiéndose producido en el año 2018 41.000 y 30.000 nuevos casos de cáncer de pulmón y cáncer colorrectal respectivamente. (9)

La incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón es entre tres y cuatro veces mayor en países desarrollados que en países en vías de desarrollo. Si bien los países desarrollados tienen un mayor desarrollo tecnológico y social que cursa con avances en técnicas diagnósticas y mayor cantidad y calidad de programas de detección precoz, el consumo de tabaco sigue siendo la principal causa de cáncer de pulmón en hombres y mujeres en Europa y América del Norte. No obstante, en las últimas décadas se observa un continuo descenso de la incidencia en estos países inducido por las campañas antitabaco y el descenso en el consumo por parte de las nuevas generaciones. (5)

USC DE COMPOSTELA

En el caso del cáncer colorrectal, la incidencia es igualmente cuatro veces superior en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo. Europa y Australia junto

con Norte América representan las áreas geográficas más afectadas encontrándose en el polo opuesto Asia Central y África. Este tipo de cáncer es considerado un indicador de desarrollo socioeconómico, pues su incidencia aumenta a la par que el consumo de productos derivados de animales acompañado de una menor actividad física. (5)

Si hablamos de esperanza de vida, los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón tienen una probabilidad de entre el 10-20% de sobrevivir cinco años tras haber sido diagnosticados, mientras que un 65% de los pacientes con cáncer colorrectal están vivos en ese plazo. (5,10) Este hecho, es atribuible a que una gran parte de los diagnósticos se realizan en estadios avanzados de la enfermedad (especialmente en pulmón).

1.3. Factores de riesgo

Las neoplasias malignas de pulmón presentan una serie de factores de riesgo conocidos, que pueden ser modificables o no modificables. Dentro de los no modificables, se encuentran la edad, el sexo, la población o los antecedentes familiares. Dentro de los factores modificables, se encuentran el consumo de tabaco, el consumo de cannabis, la exposición a sustancias tales como el asbesto, radón y arsénico, la polución, la inflamación persistente del tejido, la infección por Sars-cov-2 y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Esta información, se ve claramente evidenciada a través de los informes proporcionados por la "*American Cancer Society 2021*" (11) en los que podemos ver, que, en los Estados Unidos, un 37% de los diagnósticos se producen en hombres mayores de 75 años y que un 90% de los casos se producen en mayores de 55. Los afroamericanos son los que han representado mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad en comparación con los Hispanos y Asiático-Pacíficos en ambos sexos aunque la probabilidad en hombres se evidencia en más del doble, siendo la causa principal deeste desequilibrio el mayor consumo de tabaco.

Pese a que la mayoría de los casos son atribuibles a factores externos modificables (>90%), especialmente al consumo de tabaco (80%), el 10% de los casos están vinculados a factores no modificables. Entre dichos casos, destaca la predisposición quepresentan las mujeres a presentar alteraciones genéticas en *EGFR, CY1A1, P53, ALK* o *BRAF* independientemente del consumo de tabaco. Recientes estudios han evidenciado así mismo la influencia hormonal estrogénica en el desarrollo especialmente de adenocarcinomas. Esta mayor predisposición genética, genera que los casos de cáncer

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de pulmón en mujeres se manifiesten en edades más tempranas e histologías más agresivas.

Los análisis genéticos, también han puesto de manifiesto la importancia de la historia familiar en el desarrollo de cáncer de pulmón, así pues, el riesgo aumenta de un 1,7 si hay algún antecedente en términos generales, llegando hasta un aumento de 2 a 4 veces si hablamos de familiares en primer grado independientemente del hábito tabáquico. (12)

En cuanto a lo que al resto de factores modificables se refiere, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es el factor más influyente independiente del tabaco aumentado de 6 a 13 veces la posibilidad de desarrollar cáncer de pulmón. También, cabe destacar que en España la exposición al radón (especialmente en Galicia) es la segunda causa del desarrollo de tumores de pulmón después del tabaco. (13)

Si hablamos del cáncer colorrectal, los factores de riesgo no modificables serán la edad, el sexo, la población, los antecedentes familiares, la clase social, o la microbiota intestinal. Dentro de los factores modificables, en este caso encontraremos la enfermedad inflamatoria intestinal, la presencia de pólipos, la diabetes mellitus, la dieta,el sobrepeso, la actividad física y el consumo de alcohol y/o tabaco.

Al igual que en el cáncer de pulmón, el desarrollo del cáncer colorrectal (CRC) es debido en su mayoría a factores externos modificables, siendo únicamente entre un 2- 8% de los casos de origen hereditario (principalmente debidos a mutaciones en los genes *KRAS*, *MHL1* y *MSH2*).

La presencia de pólipos adenomatosos se da en aproximadamente el 40% de la población y aunque estos necesitan de un periodo de entre 5-15 años para transformarse en una neoplasia maligna se estima que el 95% de los cánceres colorrectales derivan de ellos. Dentro de la enfermedad intestinal inflamatoria tomarán especial relevancia la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, aumentado de 2 a 6 veces la probabilidad de manifestar la enfermedad en comparación con individuos sanos. (14)

Paradójicamente, pese a que la mayoría de los casos son atribuibles estadísticamente a factores modificables aún hoy no se conocen o se conocen vagamente los mecanismos que desencadenan o favorecen el desarrollo de esta patología. De entre los factores que conciernen a los hábitos dietéticos solamente se han podido establecer relaciones claras

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

entre el sobrepeso y la hipersecreción por parte del tejido adiposo de hormonas y citoquinas tales como TNF-α, IL-1, IL-6, IL-7 y IL-8 de las cuales se conoce su efecto disruptivo sobre el ciclo celular y funcionamiento del sistema inmune. (14,15) La obesidad supone un 50% y un 20% más de probabilidades de desarrollar la enfermedad para hombres y mujeres respectivamente.

En lo que respecta a los hábitos tóxicos, el consumo de tabaco duplica e incluso triplica la probabilidad de desarrollar CRC con respecto a un individuo no fumador. Tal es el impacto del hábito tabáquico sobre esta patología que se han llegado a relacionar un 21% de los fallecimientos con esta causa. Así mismo, el consumo de alcohol incrementael riesgo de padecer CRC desde un 20 hasta un 52% dependiendo directamente de la exposición. (16,17)

Si hablamos de los factores de riesgo no modificables, la edad avanzada supone un riesgo directamente proporcional, pues el 90% de los diagnósticos se producen enindividuos mayores de 50 años, estimándose un aumento de 3 veces el riesgo enpersonas mayores de 65 años, aunque debido a los factores dietéticos y de consumo de sustancias ya mencionados, en los últimos años se ha observado un aumento del númerode casos entre jóvenes en los EE.UU. y Europa.

Siguiendo esta línea argumental, es esperable encontrar una mayor incidencia entre poblaciones con bajos recursos económicos (mayor consumo de sustancias tóxicas, sedentarismo, dieta inadecuada) y acceso precario al sistema de salud.

En lo que respecta el sexo, al igual que en el cáncer de pulmón, los hombres tienen mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad (hasta un 30% más), con peores tasas de morbimortalidad. No obstante, las mujeres suelen presentar cuadros más avanzados al diagnóstico y con peor pronóstico. En este caso sí se presentan grandes variaciones étnicas, teniendo un 50% y un 20% más de riesgo la población no hispana negra en comparación con la población asiática y no hispana blanca respectivamente. (14,18)

1.4. Prevención y detección precoz

Numerosos factores genéticos y conductuales cursan con el desarrollo del adenocarcinoma de pulmón y colorrectal, poniéndose de manifiesto la imperante necesidad de conocer, implantar y evaluar métodos de prevención y detección precoz.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el caso del cáncer de pulmón, dado que las principales cusas están íntimamente relacionadas con el estilo de vida y hábitos, el método más efectivo de prevención es adoptar un estilo de vida saludable en el que se incluya una dieta variada, pero especialmente eliminar el consumo de tabaco. A propósito de esto último, destaca la campaña "MIPOWER" (*Protect people from tobacco smoke, Offer help to quit tobacco use, Warn about the dangers of tobacco, Enforce bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship, and Raise taxes on tobacco*) lanzada por la Organización Mundial de la Salud (WHO) gracias a la cual se redujo drásticamente el consumo de tabaco en un total de 116 países a nivel mundial. (19,20)

La quimioprevención, es también una técnica empleada para la prevención del cáncer de pulmón, que basa sus principios en el empleo de agentes naturales o no naturales, dietéticos o farmacológicos para la prevención del daño en el DNA que pueda cursar con el desarrollo de células tumorales (primeros pasos de la carcinogénesis), o bien deteniendo el desarrollo de células pretumorales en pacientes de alto riesgo (exfumadores y fumadores). Esta técnica, aunque ya ha sido validada en otros tumores como por ejemplo de mama, próstata o colon en la actualidad aún no ha revelado estadísticamente eficacia para ningún compuesto en tumores de pulmón, por lo que la retirada del consumo de tabaco sigue siendo el principal agente de prevención.

En lo que respecta a la detección precoz, los ensayos de De Koning et al. (2020), han demostrado que la realización de una tomografía axial computarizada de tórax (CT) de baja dosis anual a pacientes de alto riesgo, reduce la mortalidad a 10 años en un 24% para los hombres y un 33% para las mujeres. La realización del CT anual también cursa con un descenso en peticiones de otras pruebas complementarias y de los falsos positivos que de ellas pudiesen derivar. No obstante, la realización de este cribado supone un coste muy elevado, por lo que su implementación a nivel global sigue siendo un desafío. (21)

Si hablamos del cáncer colorrectal, nuevamente toman un papel principal las modificaciones sobre las conductas alimenticias y el consumo de sustancias tóxicas en la prevención de la enfermedad. El aumento del consumo de frutas, verdura, fibra, almidón, ácido fólico, vitamina B6 o calcio entre otros, ha demostrado correlación con una menor incidencia, aunque los resultados de los estudios siguen siendo dispares. (22)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el caso del cáncer colorrectal, la quimioprevención ha demostrado eficacia con agentes químicos tales como la aspirina, los analgésicos no esteroideos, la difluorometilornitina (DFMO), el erlotinib, la terapia hormonal en mujeres, los inhibidores de la angiotensina II, los bifosfonatos o las estatinas entre otros.

De entra ellas, destacan en primer lugar la aspirina y los analgésicos no esteroideos, los que administrados regularmente a pacientes de alto riesgo han demostrado una reducción del riesgo de entre un 20-50%. El mecanismo de acción mediante el cual producen este efecto es aún desconocido, aunque todas las hipótesis se dirigen hacia un aumento de la apoptosis e inhibición del crecimiento de las células tumorales mediante la inhibición de la ciclooxigenasa-2. (23)

En segundo lugar, cabe destacar la acción de erlotinib un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) capaz de reducir la presencia de pólipos intestinales potencialmente malignos, especialmente cuando se administra en combinación con un NSAID. (24)

Pese a tener disponible esta gran variabilidad de agentes quimiopreventivos, el diagnóstico precoz de la enfermedad jugará un papel crucial. La colonoscopia es el método de diagnóstico precoz por excelencia, pues posibilita la detección no solo de la enfermedad en sí, sino de posibles pólipos malignos; también, permite la obtención de biopsias. Otras técnicas como el enema de bario de doble contraste o la colonoscopia por tomografía computarizada son igualmente empleadas en la detección precoz del CRC, aunque su fiabilidad es mucho menor. (25) A los pacientes de alto riesgo con las características étnicas, de género y conductuales ya mencionadas se les recomienda que se involucren en programas de cribado a partir de los 45 años. (5)

En términos generales, las técnicas de cribado para ambos tipos de neoplasias malignas son mediana o altamente invasivas, por lo que, en los últimos años, se está recurriendo a técnicas de medicina de presión para el diagnóstico precoz mínimamente invasivo.

El análisis de biomarcadores en sangre está tomando un papel protagonista en la detección precoz mínimamente invasiva del cáncer. La búsqueda de dichos marcadores es llevada a cabo mediante técnicas multiómicas, es decir, mediante un conjunto de técnicas de alto rendimiento que permiten analizar una gran cantidad de componentes enuna muestra de tejido o sangre. Los principales campos científicos en los que se aplican dichas técnicas son: genómica, proteómica, transcriptómica o metabolómica entre otros.

USC DE COMPOSTELA

La detección de dichos componentes sanguíneos aporta información sobre los productos que los tumores secretan en sangre en un tipo de patología y desarrollo concreto de la misma. La detección y correcta asociación con un estadio patológico determinado de estos componentes es crucial en la detección precoz de la enfermedad y por tanto tiene un alto impacto en la supervivencia a largo plazo.

En el caso del cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal, el empleo de estas técnicas ha centrado sus esfuerzos en la detección de genes y proteínas de suero. Aunque los avances tecnológicos en materia de análisis de genómica y proteómica se han visto claramente potenciados en los últimos años, acceder a estos componentes en ocasiones aún supone un gran reto. Para superar esta barrera, la genómica y la proteómica se apoyan en disciplinas como la glicómica, metabolómica o lipidómica para la identificación de otras sustancias presenten en sangre que puedan estar alteradas. A través de estos análisis, se han detectado diferencias significativas en los azúcares, grasas y diversos elementos químicos en pacientes con tumores de pulmón y colorrectales en comparación con voluntarios sanos.

La integración y/o instauración de estas técnicas en los planes de cribado es una herramienta útil que se está implementado paulatinamente en los centros de atención especializada, y aunque su eficacia cada vez es mayor, todavía se aconsejaimplementarlas de forma complementaria a las técnicas radiómicas de imagen. (26, 27)

1.5. Transformación de la célula epitelial en adenocarcinoma

Los adenocarcinomas de pulmón y colorrectales, son tumores malignos derivados de células epiteliales caliciformes provenientes del endodermo, presentes en los revestimientos de las mucosas de las vías respiratorias y del aparato digestivo, cuya función es la producción de mucus con el fin de crear una barrera ante agentes potencialmente patógenos externos. Estas células, también secretan proteínas antimicrobianas, citoquinas y quimioquinas, por lo que también están estrechamente relacionadas con la regulación del sistema inmune. Estas son las células mayoritarias que componen los pulmones y el tracto intestinal. (28)

Para poder buscar biomarcadores que nos ayuden a realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad, en primer lugar, es crucial conocer el funcionamiento de la célula primitiva sana de la que proviene el tumor, cómo esta se comporta y las alteraciones que sufre hasta convertirse en una célula cancerígena.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las células caliciformes, son células epiteliales exocrinas muy polarizadas. Estas células a su vez se encuentran estrechamente conectadas por uniones adherentes de cadherina que conectan las mismas a través de interacciones homotípicas entre sus dominios extracelulares, por tanto, el dominio celular apical será el excretor, mientras que en el dominio central (secretor) se dispondrán numerosas mitocondrias y un gran aparato de Golgi. El dominio basal estará en contacto con la membrana basal y en él se encuentra el núcleo celular. Así pues, el dominio apical será el que se encuentre en contacto con el exterior, mientras que el dominio basal estará en contacto estrecho con los tejidos y sistemas internos del organismo. (28)

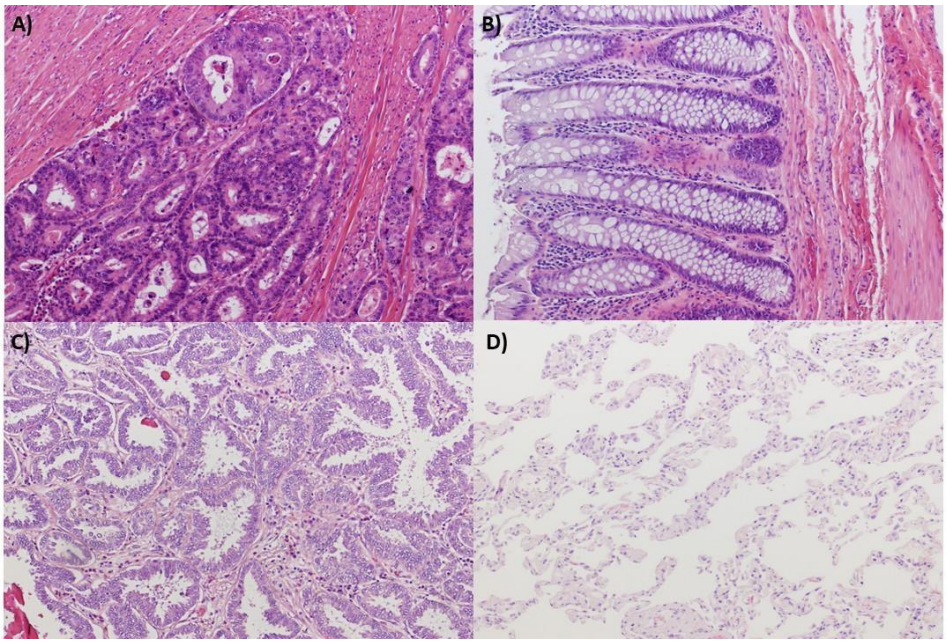


***Figura 2*. Histología de tejido tumoral y sano de pulmón y de colon:** *A) Adenocarcinoma de colon (glándulas neoplásicas infiltrando la lámina muscular propia), HE, x10. B) Mucosa normal del colon (tejido sano), HE, x10. C) Adenocarcinoma de pulmón (tipo acinar), HE, x10. D) Tejido alveolarpulmonar normal (tejido sano), HE, x10*

Esta polaridad en la organización celular es la que permite el transporte de sustancias a través del epitelio. Las integrinas y las proteínas transmembrana, son las principales encargadas del anclaje de estas células a la membrana basal subyacente, y están producidas en su mayoría por el propio epitelio y por los fibroblastos circundantes.

La distribución de canales iónicos a través de los diferentes dominios celulares es indispensable para la sustentación de esta polaridad, y favorece la correcta distribución de iones y agua en la célula. La renovación fisiológica de este tejido se produce continuamente, en intervalos de entre 3 a 7 días a partir de las células madre epiteliales

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

situadas en la base celular cuando reciben las señales generadas tras la transcripción y traducción de una gran cantidad de genes. Este rápido recambio celular sumado a que estas células son las primeras en entrar en contacto con los agentes nocivos externos (y por ende las primeras en acusar su impacto), son las causas de que la prevalencia de neoplasias malignas derivadas de estas células sea tan elevada. (28)

Los estudios más recientes, han puesto en evidencia cuatro factores principales por los que la célula caliciforme desarrolla su tumorigénesis y comienza a dividirse descontroladamente. Estos son: la pérdida de polaridad celular, la migración celular colectiva, la transición epitelio-mesenquimal y las interacciones célula estroma. (29)

La pérdida de la polaridad basal-apical es una de las principales señas del cáncer epitelial. Dicha polaridad, se mantiene gracias a la acción de tres conjuntos de proteínas denominadas reguladoras de la polaridad, estas son: proteínas que establecen y mantienen las membranas basolaterales (Scrib, Lgl, Dlg); proteínas que regulan lamembrana apical, la biogénesis y el mantenimiento (Crumbs/PALS/PATJ) y proteínas que median la función de las uniones celulares (Par3/Par6/aPKC). La interrupción del funcionamiento de estos complejos proteicos da lugar a la pérdida de la polaridad celular, aunque los mecanismos específicos mediante los que se provoca esta pérdida aún son desconocidos. El mal funcionamiento de estos complejos proteicos suele cursar con la formación de neoplasias malignas cuando se produce bajo la sobreactivación de uno o varios protooncogenes reguladores de la polaridad o la inactivación de genes supresores de tumores. En el adenocarcinoma colorrectal, esto ocurre principalmente cuando se produce la activación de los genes *SCRIB, DLG1*, *LLGL1* o *INADL*; mientras que en el adenocarcinoma de pulmón sucede principalmente con la activación de los genes *PRKCI* y *STK11*. La pérdida celular de la polaridad en el caso de los adenocarcinomas que se están exponiendo en este texto estará relacionado con estadios tempranos de la enfermedad. (29,30)

La migración o diseminación celular es el movimiento de varias células hacia una localización concreta con el fin de alcanzar la membrana extracelular conservando características histológicas similares a las de la célula del tejido desde donde migran (tejido de origen), en este caso a la célula epitelial. Esta es la primera fase del proceso de transición epitelio-mesenquimal; proceso en cuya fase final la célula primaria se encuentra completamente desdiferenciada. Estos movimientos, se producen para el desarrollo y mantenimiento del organismo, aunque los errores durante el mismo pueden

generar tumores. La migración celular en los adenocarcinomas es el primer paso hacia el desarrollo del proceso de metástasis. (31)

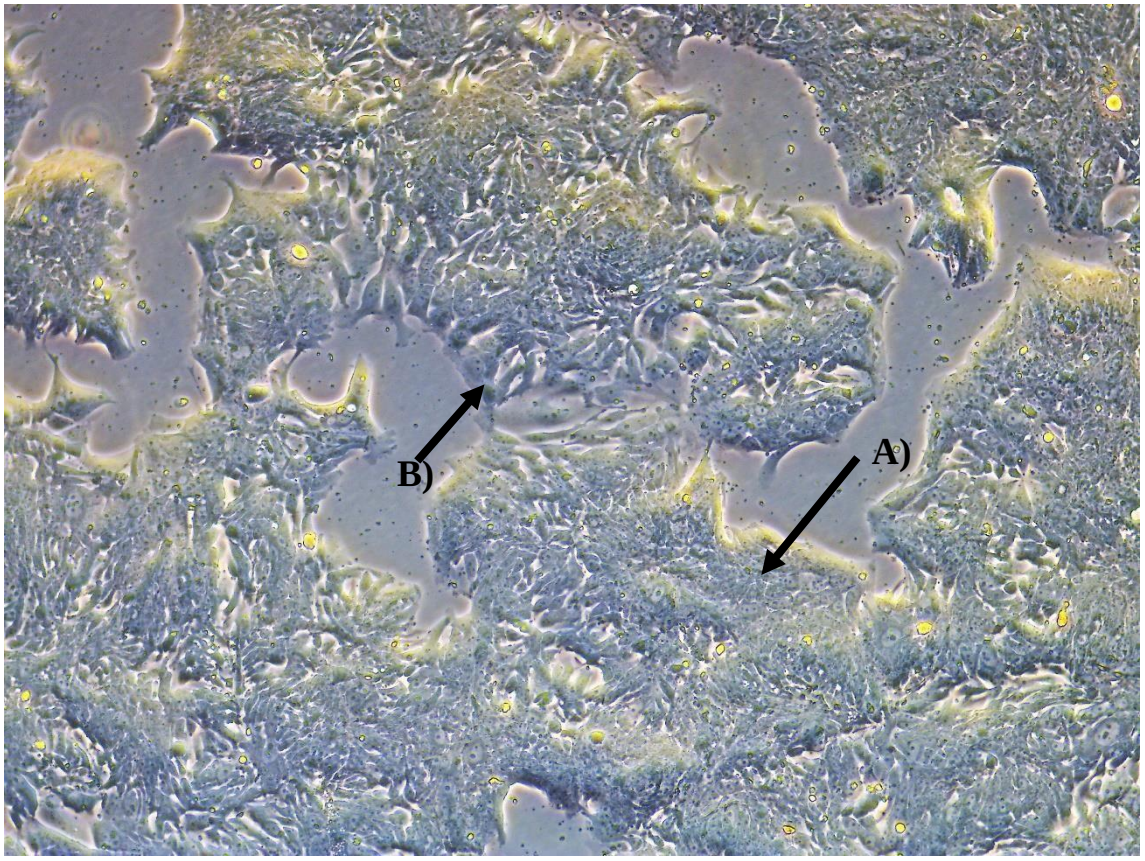


***Figura 3**. **Proceso de migración celular de célula epitelial a mesenquimal:** A) célula epitelial de colon, B) célula mesenquimal de colon*

Estos movimientos, se suelen llevar a cabo con la asociación de la célula pro-tumoral con fibras de la matriz extracelular. Algunas de estas fibras, convergen en los vasos sanguíneos, proporcionando a las células tumorales los nutrientes y el oxígeno necesarios para sobrevivir y proliferar desconectadas de su matriz de origen, al mismo tiempo que les facilita la entrada en el torrente sanguíneo y en consecuencia su dispersión a tejidos circundantes.

Para que la migración sea dirigida, debe estar guiada por quimioatrayentes producidos por otras células y difundidos por el sistema circulatorio. Una vez recibido el estímulo, el primer paso que llevará a cabo la célula es traspasar la barrera celular. Este proceso está dirigido por la polimerización de la actina a nivel local y propiciará el arrastre de las células hacia la matriz extracelular mediante la extensión de pseudópodos. Estos pseudópodos se unirán a fibras que contiene colágeno propiciando estructuras de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

adhesión dinámica o complejos celulares. La sobreexpresión de estas moléculas de adhesión en células tumorales es por tanto el factor principal que dará lugar a lamigración celular. Recientes estudios *in vitro* también han demostrado la presencia de macrófagos durante este proceso, los cuales son capaces de degradar la matriz extracelular y por tanto favorecen la entrada de células tumorales al torrente sanguíneo. (31,32)

Entre los principales genes implicados en la formación de pseudópodos se encuentran los que codifican para la activación de la vía de la cofilina, principal proteína encargada de aumentar los extremos activos de las fibras de actina para su posterior polimerización. Esta vía se ha visto activada en sinergia con el complejo proteico Arp2/3 encargado del control de la disposición de la actina en el citosol celular. El aumento de fibras de actina se ha relacionado con la quimioatracción directa de las células tumorales hacia el receptor del factor de crecimiento epidérmico cuya activaciónproporcionará señales de división a las células (EGF). Por tanto, la mutación del gen *EGFR* y la consiguiente sobreexpresión del receptor de EGFR aumentará esta víaoncogénica. (31,32)

Estas protrusiones celulares (pseudópodos) debido a la polimerización de la actina, se transforman en invadopodios que también tienen la capacidad de degradar la membrana basal de los vasos sanguíneos, activando así el proceso de angiogénesis que permitirá la supervivencia de la célula tumoral desarraigada de su lámina basal. La sobreexpresión de EGFR también se ha puesto en relación con la formación de estos invadopodios y el proceso de angiogénesis. Otra estructura de adhesión rica en actina muy similar a los invadopodios son los podosomas solo que estas están derivadas de macrófagos bajo la activación de los genes *SCR* o *RAS*.

El principal gen implicado en la carcinogénesis de los adenocarcinomas de pulmón y colorrectal es *EGFR*. En el lado opuesto, el principal gen encargado de la supresión de esta vía es *P53* a través de la inhibición de la nucleación de la actina (fase lenta del proceso de polimerización) vía Arp2/3. (33) Así mismo, en el caso del cáncer colorrectal el gen *DCC* jugará un papel importante en la inhibición de este proceso de invasión celular en tanto que cuando el receptor de netrina-1 se encuentra bloqueadoeste gen inhibe la vía de la proteína quinasa PI3k (implicada en la activación de *EGFR*). La desregulación de este gen dará lugar por tanto a la activación de la vía PI3k y la migración celular. (34,35)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La transición epitelio mesenquimal sería el estado final de las trasformaciones que sufre la célula en su camino hacia la conversión a célula migratoria. Para que esta transformación se complete, a la pérdida de polaridad, la pérdida de adhesión celular o la pérdida de adhesión a la matriz celular, procesos que ya se han descrito anteriormente, habría que añadirles la alteración del citoesqueleto celular, que cursa conla desregulación en los procesos de transcripción y traducción de los genes que regulan la división celular en este caso de las células epiteliales del pulmón y colorrectales.Cabe destacar, que, aunque este es un proceso fisiológico normal que el organismo utiliza para mantener la homeostasis de sus sistemas, cuando se activa bajo señales de regulación aberrantes torna en la fase más agresiva de la célula tumoral.

En el adenocarcinoma, los principales acontecimientos que provocan la alteración de la transcripción y traducción de los genes que regulan la transición EMT son: metilación de dinucleótidos CpG del DNA, modificación de proteínas histonas medianteacetilación, biotinilación, metilación, fosforilación, SUMOilación y cambios en el RNA no codificante. (36)

Cuando alguna de estas señales aberrantes se produce, activa numerosas vías de señalización celular que culminan con la sobreexpresión de los factores de transcripción implicados en el proceso de EMT; Zeb, Snail, Slug y Twist (ver Figura 4). Cuando la transición está completada, las células epiteliales habrán perdido todos sus marcadores clásicos ganando los de las células mesenquimales (con especial relevancia el de fibronectina; glucoproteína capaz de generar una matriz celular temporal para la unión y diseminación celular). (36,37)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

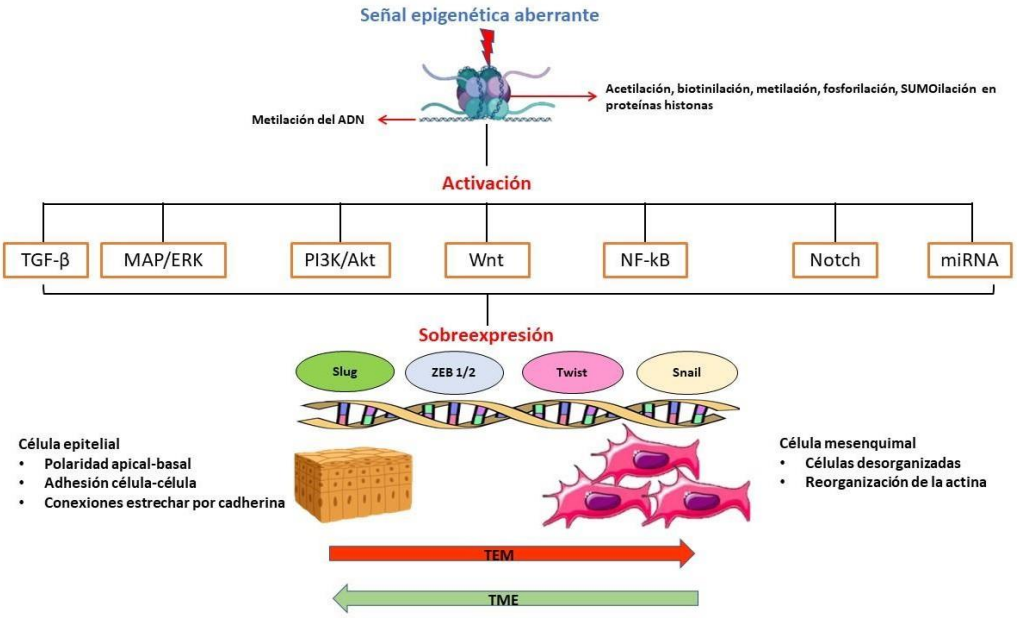


Figura 4. Proceso de transición EMT

De entre las vías que se activan destacan la de TGF-β, la MAP/ERK y la PI3K/Akt. La vía de TGF-β estará implicada para ambos tipos de adenocarcinomas, cuando se produzca la acetilación de histonas derivada de la expresión del gen *SMAD2* (proto- oncogen). En el caso de MAP/ERK será activada de manera aberrante principalmenteen presencia de una mutación de los genes *KRAS* (proto-oncogen) o *RAF* (proto- oncogen), mientras que la vía PI3K/Akt lo hará a causa de los genes *EGFR* o *ROS1* (proto-oncogenes). (36,37) La cascada de activación de estas vías promotoras de la EMT es sumamente compleja y en ocasiones sinérgica con otras; conocer con exactitud sus fases es hoy un desafío pendiente para la comunidad científica, debido a que, al ser un proceso reversible, estas se convierten en la diana terapéutica ideal.

Así mismo, recientes estudios, han evidenciado la capacidad de las células para recuperar su estado pluripotente mientras transcurren por este cambio EMT. La recuperación de dicha capacidad en una célula ya dañada puede ser la causa de la aparición de células madre cancerosas (máxima capacidad expansiva). (38)

Finalmente destacan las interacciones de la célula epitelial con el estroma y su implicación en la transición hacia la célula tumoral. El microambiente estromal, se compone principalmente de parte de la matriz extracelular, factores secretados porcélulas, y células del estroma que incluyen fibroblastos y células inmunitarias.

USC
DE COMPOSTELA

Estudios *in vitro* e *in vivo* han evidenciado la presencia de un microambiente estromal proinflamatorio en los estadios tempranos de transformación de la célula epitelial hacia célula cancerosa, con una fuerte presencia de fibroblastos activados antes del inicio de la fase invasiva. Estos fibroblastos son reclutados en mayor cantidad debido al aumento de señales celulares producidas por las células epiteliales dañadas, y su activación, promueve el reclutamiento de células inmunitarias, así como la alteración de la angiogénesis tumoral a través de la vía NF-kB. Tras su activación, estos también alteransu fenotipo celular aumentado la expresión de la proteína α-SMA (isoforma de la actina)que favorece la migración tumoral, así como la pérdida de adherencia entre las células epiteliales (suprime E-caderina). Este fenotipo altamente secretor promueve así mismo la carcinogénesis en tanto que secreta factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias (39,40).

El proceso por el que una célula epitelial pulmonar o colorrectal se transforma en adenocarcinoma es sumamente complejo y requiere no solo de la interacción entre numerosos genes, biomoléculas y células del organismo, sino también de la interacción del medio externo con todos ellos. Desentrañar la naturaleza de dichas interacciones será por tanto la llave hacia el diagnóstico y tratamiento de precisión.

2. Diagnóstico y estadificación: de las técnicas clásicas a la medicina de precisión

2.1. Anatomía e histología: adenocarcinoma de pulmón

Los pulmones son los órganos que se sitúan dentro de la cavidad torácica uno a cada lado del mediastino protegidos por las costillas. El pulmón derecho, es más grande que el izquierdo (debido al espacio ocupado por el corazón) y tiene tres lóbulos (superior, medio e inferior) resultante de la división de las cisuras mayor y menor. Por su parte, el pulmón izquierdo presenta dos lóbulos (superior e inferior) separados por una única cisura llamada oblicua. A su vez, cada lóbulo está dividido en segmentos correspondiéndoles a cada uno un bronquio segmentario que a su vez se divide en bronquios, bronquiolos y estos finalmente en alvéolos o unidades funcionantes para el intercambio de gases. Ambos pulmones se encuentran recubiertos por una doble membrana de tejido conjuntivo llamada pleura en cuyo interior se haya el líquidopleural (lubricante). (41)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La irrigación sanguínea rica en oxígeno llega a través de la arteria pulmonar directamente desde el ventrículo derecho que se ramifica en primer lugar en dos ramas (hilio pulmonar), una hacia cada pulmón, las cuales seguirán ramificándose progresivamente siguiendo el mismo trayecto que las vías respiratorias. Las arterias bronquiales que surgen directamente de la arteria aorta también transportan sangre rica en O_2 especialmente a los bronquios y bronquiolos. Por otra parte, la sangre rica en CO_2 y productos de desecho derivados del intercambio gaseoso se eliminan a través de las venas pulmonares (2 procedentes de cada pulmón) en la aurícula izquierda. (42)

La inervación del pulmón se lleva a cabo principalmente a través del nervio vago y los ganglios torácicos simpáticos 4º y 5º que contribuyen con fibras que forman los plexos pulmonares anterior y posterior en el hilio pulmonar y se ramifican hasta llegar a los alveolos. (43)

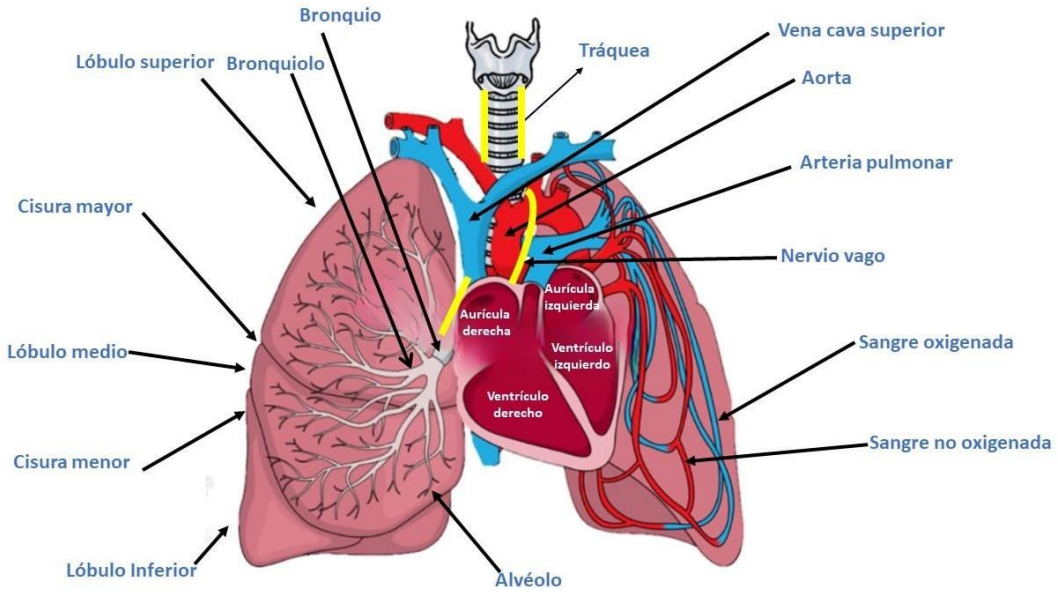


Figura 5. Anatomía del pulmón

Los adenocarcinomas de pulmón se originan en el tejido epitelial que recubre las vías aéreas, desde los bronquios principales hasta los alvéolos más pequeños.

El diagnóstico histológico se consigue a través de la obtención de una muestra de tejido mediante procedimientos como la fibrobroncoscopia, broncoaspirado, biopsia bronquial o transbronquial, ultrasonografía endobronquial (EBUS), ultrasonografía endoscópica

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(EUS) o punción-aspiración con aguja fina (PAAF) que se aplicarán teniendo en cuanta la localización de la lesión y las características del paciente. (44,45)

Una vez confirmada la arquitectura celular epitelial con diferenciación glandular del tumor este también se puede subclasificar atendiendo a su patrón histológico, a criterios de invasión y a criterios de desdiferenciación. Atendiendo a los últimos criterios establecidos por la WHO, los adenocarcinomas pulmonares pueden presentar los siguientes patrones histológicos (nombrados de mayor a menor frecuencia) (41):

- Lepídico: crece a lo largo de las estructuras preexistentes sin destruir la estructura alveolar, es decir, ni invasión estromal ni vascular. Presenta un tamaño máximo de 3 cm.
- Acinar: agrupación de células tumorales en forma glandular que rodean unlumen central.
- Papilar: crecimiento papilar del tumor a lo largo de un núcleo fibrovascular.
- Micropapilar: crecimiento en forma de pequeños nidos papilares sin núcleo fibrovascular.
- Sólido: patrón predominante sin evidencia de patrón lepídico, acinar, papilar o micropapilar. Si el patrón sólido es del 100 %, debe haber, al menos, 5 o más células productoras de mucina por cada dos campos de aumento, comprobadas con tinción de histoquímica.
- Mucinoso: corresponde al antes denominado BAC mucinoso con morfología columnar o de células caliciformes con abundante mucina intracitoplasmática. Además del patrón lepídico, también puede presentarse con otros patrones.
- Coloide: muestra abundante mucina reemplazando los espacios aéreos.
- Fetal: estructura histológica semejante a tejido pulmonar fetal.
- Entérico: estructura histológica semejante al adenocarcinoma colorrectal.

En cuanto al nivel de invasión, el adenocarcinoma in situ se define como aquella lesión menor de 3 cm y cuyo patrón de crecimiento celular se limita a las paredes celulares sin invasión del intersticio. Adenocarcinoma invasivo es aquella lesión maligna que sí invade el intersticio. (45)

Con respecto al grado de diferenciación, encontraremos adenocarcinomas de alto grado o pobremente diferenciados, cuando las células de la biopsia examinadas bajo el microscopio presenten una apariencia anormal; adenocarcinomas moderadamente

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

diferenciados cuando las células conservan solamente algunas características de las células normales del tejido de origen y adenocarcinomas de bajo grado o bien diferenciados cuando dichas células tengan una apariencia muy similar a las células normales del tejido pulmonar. (45)

En ocasiones, el diagnóstico histológico no es suficiente, y necesita apoyarse en las técnicas inmunohistoquímicas para poder concretar con exactitud la histología, el nivel de invasión, así como el grado de los adenocarcinomas de pulmón. Para confirmar la histología, se comprueba la presencia o ausencia de CD56, p63, p40, napsina A, TTF-1 o citoqueratina 5/6 entre otros. La histología de adenocarcinoma presentará, p63 y p40 negativos o con baja expresión, mientras que napsina A, TTF-1 y CD56 deben ser positivos. (46)

Si hablamos del nivel de invasión del tumor, recurriremos a los marcadores D2-40 o CD34 para determinar si este ha infiltrado el sistema linfovascular. La positividad de dichos marcadores sería un fuerte indicativo de que el tumor ha rebasado el lumen vascular y/o linfático pronosticando una propagación acelerada y un alto riesgo de aparición de metástasis a distancia. (46)

Los marcadores citoqueratina 7, CK20, CDX2, proteína GCDFP, receptor de estrógenos (ER) o receptor de progesterona (PR) se utilizarán para determinar el nivel de invasión del tumor, así como su origen primario o metastásico en el tejido pulmonar. En este caso, la positividad de CK7 indicará que el adenocarcinoma es un tumor primario de pulmón, mientras que la expresión de CDX2 y CK20 indicará origen intestinal, mientras que GCDFP, ER o PR positivos indicarán un posible origen mamario. (46)

2.2. Test diagnósticos en adenocarcinoma de pulmón

El diagnóstico del adenocarcinoma de pulmón se lleva a cabo principalmente a través de una evaluación radiológica mediante CT, MRI, PET-CT; identificación de marcadores tumorales en suero sanguíneo, realización de una biopsia de la lesión y evaluación clínica de signos y síntomas.

Los signos y síntomas clínicos del adenocarcinoma de pulmón dependerán en gran medida del estadio en el que se encuentre el tumor. De este modo, cuando la enfermedad se encuentre en una fase temprana los síntomas más frecuentes serán el cansancio generalizado o la tos persistente, pasando por dolor torácico, sibilancias,

USC UNIVERSIDADE

disnea, esputo hemoptoico o pérdida de peso sin razón aparente en fases más avanzadas. Si la enfermedad es metastásica, también podrá presentar síntomas específicos de las zonas afectadas (45).

El adenocarcinoma de pulmón también puede presentarse acompañado de otras alteraciones tales como neumonías recurrentes, o del agrandamiento de los ganglios linfáticos torácicos, supraclaviculares o cervicales que podrán ser detectados a través de la exploración clínica del paciente.

En cuanto, al análisis de marcadores tumorales en suero sanguíneo, los más relevantes son CEA, TPA, CA19.9, CA125 o CYFRA 21-1. Los valores elevados de estos marcadores en suero se correlacionan directamente con estados avanzados de la enfermedad, aunque al no tener ninguno de ellos especificidad suficiente por sí mismo para ser una prueba diagnóstica única, son más útiles en el seguimiento ymonitorización de respuesta al tratamiento. (47,48)

Con respecto a las pruebas radiológicas, la prueba diagnóstica de elección será el TAC. La interpretación radiológica de las lesiones de pulmón es especialmente compleja y requiere de una alta especialización por parte del radiólogo, no obstante, pueden agruparse en las siguientes categorías (49):

- Nódulo Sólido: área focalizada que presenta un aumento de densidad con respecto al parénquima pulmonar, que además ensombrece el resto del parénquima y mide menos de 3 cm.
- Nódulo subsólido: cualquier nódulo que contenga elementos de densidad menor que el nódulo sólido.
- Nódulo en vidrio deslustrado puro: área de aumento de densidad que ensombrece el parénquima, pero permite ver las marcas bronquiales y vasculares
- Nódulo parcialmente sólido: opacidad focal que contenga componente sólido y en vidrio deslustrado.

Cuanto mayor densidad presente la lesión identificada por CT, más invasiva es la lesión histológicamente, siendo por tanto los adenocarcinomas preinvasivos (in situ) lesiones de tipo vidrio deslustrado puro, los adenocarcinomas mínimamente invasivos lesiones subsólidas o mixtas y los adenocarcinomas invasivos lesiones sólidas. (49)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El CT tiene una precisión limitada para la identificación de infiltración tumoral en ganglios y en la detección de enfermedad postratamiento. En aquellos casos en los que las lesiones identificadas no puedan ser claramente atribuibles a otra patología no oncológica (por ejemplo, infección en el caso de los nódulos en vidrio deslustrado) se recomienda el estudio de la actividad metabólica de la lesión mediante PET-CT. Esta prueba es capaz de detectar células tumorales metabólicamente activas y además de poner de manifiesto la presencia de enfermedad en localizaciones clínicamente nosospechosas, siendo por tanto la prueba de elección para identificar enfermedad adistancia. (50) La MRI se utiliza principalmente como método para descartar la presencia de enfermedad en el sistema nervioso central.

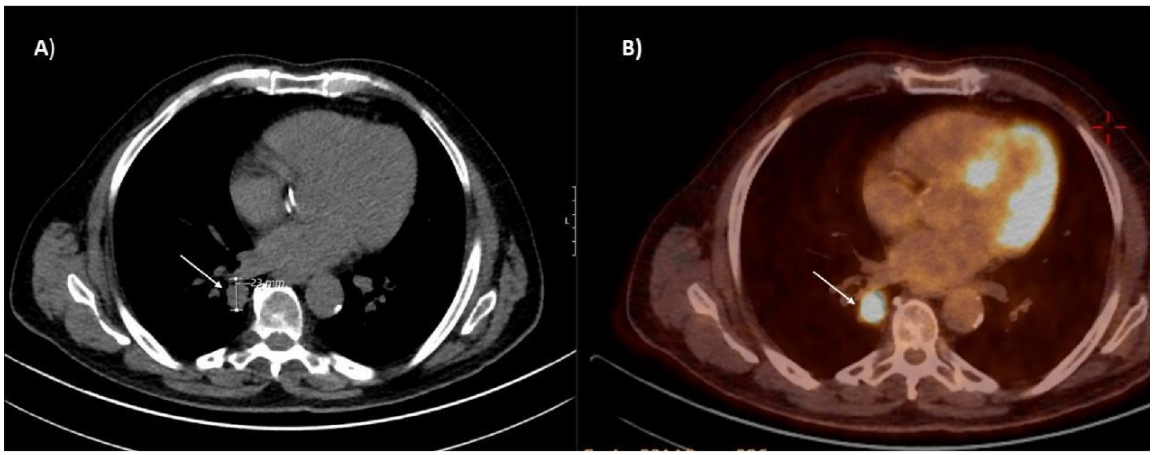


Figura 6. Imagen de adenocarcinoma de pulmón obtenida por A) CT vs B) PET-CT

Una vez se ha identificado radiológicamente la presencia de una lesión sospechosamente maligna se procederá a realizar una biopsia de esta mediante fibrobroncoscopia, broncoaspirado, biopsia bronquial, transbronquial, ultrasonografía endobronquial (EBUS), ultrasonografía endoscópica (EUS) o punción-aspiración con aguja fina (PAAF). La técnica que se emplea actualmente como estándar de calidad esel EBUS, ya que es una técnica mínimamente invasiva que puede realizarse de manera ambulatoria, con un bajo coste y permite la extracción de fragmentos de la lesión sospechosa de muy alta calidad. (51)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.3. Estadificación del adenocarcinoma de pulmón

Una vez son conocidas todas las características anteriormente nombradas, el siguiente paso para concluir el diagnóstico es interpretar los resultados conjuntamente para determinar el estadio en el que se encuentra el tumor.

El sistema de estadificación empleado con más frecuencia para el adenocarcinoma de pulmón es el sistema TNM del "*American Joint Committee on Cancer"* (AJCC) 8ª edición (versión de 2018), que se basa en tres criterios principales (52):

- Tamaño y extensión del tumor (T).
- Afectación de los ganglios linfáticos adyacentes (N).
- Extensión a zonas distantes (M).

A cada una de estas letras se les asigna un número del 0 al 4, indicando los números más altos que el cáncer está más avanzado. El sufijo X indica que no se puede realizar una evaluación precisa por falta de información. La estadificación completa del adenocarcinoma de pulmón se recoge en la siguiente tabla.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Estadificación TNM del cáncer de pulmón. Adaptado de la guía de la AJCC 8ª edición (versión de 2018)

Estadio	T	N	M	Descripción
Cáncer oculto	TX	N0	M0	No se puede evaluar el tumor principal, o las células cancerosas se observan en una muestra de esputo (flema) o en otros líquidos del pulmón, pero el cáncer no es detectado por otras pruebas, de manera que la localización del cáncer no se puede determinar (Tx). No hay diseminación en ganglios (N0). No hay diseminación a distancia (M0)
0	Tis	N0	M0	El tumor se encuentra solo en las capas superiores de las células que revisten las vías respiratorias (Tis). No hay diseminación en ganglios (N0). No hay diseminación a distancia (M0)
IA1	T1a	N0	M0	El tumor es < 1cm de ancho (T1a). No hay diseminación en ganglios (N0). No hay diseminación a distancia (M0)
IA2	T1b	N0	M0	El tumor es >1cm, pero < 2cm de ancho (T1b). No hay diseminación en ganglios. (N0). No hay diseminación a distancia (M0)
IA3	T1c	N0	M0	El tumor es > 2cm, pero inferior a 3 cm de ancho (T1c). No hay diseminación en ganglios (N0). No hay diseminación a distancia (M0)
IB	T2a	N0	M0	El tumor es > 3cm, pero < 4cm de ancho (T2a). No hay diseminación en ganglios (N0). No hay diseminación a distancia (M0)
IIA	T2b	N0	M0	El tumor es > 4cm, pero < 5cm (T2b). No hay diseminación en ganglios (N0). No hay diseminación a distancia (M0)
IIB	T1a/b/c	N1	M0	El tumor es < 1cm de ancho (T1a). El tumor es >1cm, pero < 2cm de ancho (T1b). El tumor es > 2cm, pero inferior a 3 cm de ancho (T1c). Propagación a los ganglios linfáticos del pulmón donde se encuentra el tumor primario o a los ganglios hiliares (N1). No hay diseminación a distancia (M0)
	T2a/b	N1	M0	El tumor es > 3cm, pero < 4cm de ancho (T2a). El tumor es > 4cm, pero < 5cm (T2b). Propagación a los ganglios linfáticos del pulmón donde se encuentra el tumor primario o a los ganglios hiliares (N1). No hay diseminación a distancia (M0)
	T3	N0	M0	El tumor es > 5cm, pero <7cm de ancho (T3). No hay diseminación en ganglios (N0). No hay diseminación a distancia (M0)
IIIA	T1a/b/c	N2	M0	El tumor es < 1cm de ancho (T1a). El tumor es >1cm, pero < 2cm de ancho (T1b). El tumor es > 2cm, pero inferior a 3 cm de ancho (T1c). Propagación a los ganglios linfáticos que se encuentran alrededor de la carina o el mediastino en el mismo lado en el que se encuentra el tumor primario (N2). No hay diseminación a distancia (M0)
	T2a/b	N2	M0	El tumor es > 3cm, pero < 4cm de ancho (T2a). El tumor es > 4cm, pero < 5cm (T2b). Propagación a los ganglios linfáticos que se encuentran alrededor de la carina o el mediastino en el mismo lado en el que se encuentra el tumor primario (N2). No hay diseminación a distancia (M0)
	T3	N1	M0	El tumor es > 5cm, pero <7cm de ancho (T3). Propagación a los ganglios linfáticos del pulmón donde se encuentra el tumor primario o a los ganglios hiliares (N1). No hay diseminación a distancia (M0)
	T4	N0/1	M0	El tumor es > 7 cm de ancho o ha invadido el mediastino, la tráquea, el esófago, el diafragma, la columna vertebral, la carina o hay dos o más nódulos tumorales separados en distintos lóbulos del mismo pulmón (T4). No hay diseminación en ganglios (N0). Propagación a los ganglios linfáticos del pulmón donde se encuentra el tumor primario o a los ganglios hiliares (N1). No hay diseminación a distancia (M0)
IIIB	T1a/b/c	N3	M0	El tumor es < 1cm de ancho (T1a). El tumor es >1cm, pero < 2cm de ancho (T1b). El tumor es > 2cm, pero inferior a 3 cm de ancho (T1c). Propagación a los ganglios linfáticos cercanos a la clavícula en cualquiera de los lados y /o propagación a los ganglios linfáticos hiliares o mediastínicos del lao opuesto al que se encuentra el tumor primario (N3). No hay diseminación a distancia (M0)
	T2a/b	N3	M0	El tumor es > 3cm, pero < 4cm de ancho (T2a). El tumor es > 4cm, pero < 5cm (T2b). Propagación a los ganglios linfáticos cercanos a la clavícula en cualquiera de los lados y /o propagación a los ganglios linfáticos hiliares o mediastínicos del lao opuesto al que se encuentra el tumor primario (N3). No hay diseminación a distancia (M0)
	T3	N2	M0	El tumor es > 5cm, pero <7cm de ancho (T3). Propagación a los ganglios linfáticos que se encuentran alrededor de la carina o el mediastino en el mismo lado en el que se encuentra el tumor primario (N2). No hay diseminación a distancia (M0)
	T4	N2	M0	El tumor es > 7 cm de ancho o ha invadido el mediastino, la tráquea, el esófago, el diafragma, la columna vertebral, la carina o hay dos o más nódulos tumorales separados en distintos lóbulos del mismo pulmón (T4). Propagación a los ganglios linfáticos que se encuentran alrededor de la carina o el mediastino en el mismo lado en el que se encuentra el tumor primario (N2). No hay diseminación a distancia (M0)
IIIC	T3	N3	M0	El tumor es > 5cm, pero <7cm de ancho (T3). Propagación a los ganglios linfáticos cercanos a la clavícula en cualquiera de los lados y /o propagación a los ganglios linfáticos hiliares o mediastínicos del lao opuesto al que se encuentra el tumor primario (N3). No hay diseminación a distancia (M0)
	T4	N3	M0	El tumor es > 7 cm de ancho o ha invadido el mediastino, la tráquea, el esófago, el diafragma, la columna vertebral, la carina o hay dos o más nódulos tumorales separados en distintos lóbulos del mismo pulmón (T4). Propagación a los ganglios linfáticos cercanos a la clavícula en cualquiera de los lados y /o propagación a los ganglios linfáticos hiliares o mediastínicos del lao opuesto al que se encuentra el tumor primario (N3). No hay diseminación a distancia (M0)
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	Propagación al otro pulmón, presencia de derrame pleural maligno o derrame pericárdico maligno (M1a)
	Cualquier T	Cualquier N	M1b	Propagación a distancia formando un tumor fuera del pecho ya sea en ganglios linfáticos a distancia u otros órganos (M1b)
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c	Propagación a distancia formando más de un tumor fuera del pecho ya sea en ganglios linfáticos a distancia u otros órganos. (M1c)

Cuanto mayor es el estadio tumoral en el momento del diagnóstico, mayor es la extensión de la enfermedad y por tanto presenta un peor pronóstico. La detección en estadios tempranos del adenocarcinoma de pulmón estará por tanto directamente relacionada con el aumento de la supervivencia a largo plazo y el descenso del índice demorbimortalidad.

2.4. Nuevas técnicas para el diagnóstico del adenocarcinoma de pulmón

En las últimas décadas, el desarrollo exponencial de la industria tecnológica biomédica ha posibilitado el análisis en profundidad de muestras humanas de diversa índole desde múltiples aproximaciones. Así mismo, la tecnología computacional actual ha permitido la compilación e integración de dichos análisis, dando lugar a un cuerpo de conocimiento preciso y completo sobre el comportamiento de numerosas patologías.

Como ya se ha mencionado previamente en este trabajo, los tumores son heterogéneos y van mudando sus características conforme se van desarrollando, por lo que para un adecuado diagnóstico y manejo terapéutico es necesario poder analizar dichos cambios. Las técnicas clásicas de análisis histopatológico presentan una instantánea de una fracción del tumor en un momento concreto de su desarrollo y no son capaces de inferir su dinámica futura.

Para sobreponerse a estas limitaciones, la comunidad científica y los clínicos se apoyan en nuevas técnicas de análisis entre las que destacan la secuenciación de genomacompleto (WGS), la secuenciación de RNA (RNA-seq), el análisis de las proteínas (proteómica) o el análisis de las fosfoproteínas (fosfoproteómica) entre otras.

El desarrollo de estas técnicas se está llevando a cabo en tejido con el fin de optimizar y obtener el máximo rendimiento de las muestras obtenidas por biopsia y evitar someter al paciente múltiples veces a este proceso invasivo. No obstante, actualmente se está intentado obtener esta información molecular a partir de sangre completa o suero, y poder así monitorizar la evolución del tumor. A la realización de estos análisis en sangreo suero humano se le conoce como biopsia líquida.

A través de la secuenciación del genoma completo, se busca caracterizar los cambios que alteran la secuencia de nucleótidos del DNA. Estos cambios, se producen principalmente por deleciones, inserciones, o sustituciones de uno o varios nucleótidos que cuando se producen especialmente en las regiones codificantes de los genes dan

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lugar a la síntesis de proteínas aberrantes que envían señales de la misma naturaleza a la célula, desestabilizando los procesos de replicación, desarrollo y muerte celular. No obstante, la secuenciación masiva ha permitido identificar alteraciones en regiones "no codificantes" potencialmente relacionadas con la alteración de algunas vías de señalización molecular.

La identificación del fenómeno de adicción oncogénica en el adenocarcinoma de pulmón ha resultado en la tipificación de los genes *EGFR, KRAS, ALK, ROS, ERB2, BRAF, MET, RTK* como los principales implicados en el desarrollo de esta patología.
(41) La mayoría de los adenocarcinomas de pulmón se producen en consecuencia a la activación de la proteína quinasa mediante mitógenos (MAPK) resultante de las alteraciones en los receptores tirosina quinasa (RTKs) y la activación aberrante de la cascada de proteínas RAS/RAF/MEK y sus reguladores. (53-56)

Recientes estudios han identificado alteraciones en los reguladores de la vía de señalización celular RAS/RAF/RTK en el 70-80% de los adenocarcinomas de pulmón. La activación aberrante de dicha vía de señalización se puso en relación directa con la presencia de mutaciones en oncogenes como *EGFR, BRAF, ALK, RET, ROS1* y *KRAS*. En el 20-30% restante de los casos en los que no se identificó una alteración de la vía RAS/RAF/RTK todavía se requiere la realización de más análisis para poder determinar si estos constituyen una entidad evolutiva única, si representan variantes patogénicas no identificadas de dicha vía o si simplemente hablamos de errores técnicos de laboratorio. (53,54,55,56)

Las alteraciones que se produce en la secuencia de nucleótidos de los genes identificados como precursores de la activación aberrante de la vía RAS/RAF/RTK son difíciles de determinar con exactitud, aunque en términos generales las variaciones somáticas (no heredadas y causadas por factores externos) se producen en un 75% enlos pares de bases C.G siendo el cambio más frecuente la transversión C.G-A.T. La cantidad de mutaciones de los genes (carga mutacional) no es homogénea, aunque si se ha visto aumentada en fumadores. Las variaciones germinales (heredables) ocurren en los pares de bases C.G en un 51% aproximadamente mientras que las transiciones más frecuentes fueron A.T-G.C y C.G-T.A . (53,54,55,56)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La consecuencia de estas variaciones sobre la estructura de los oncogenes implicados en el adenocarcinoma de pulmón es la activación de *KRAS, EGFR, BRAF, ERBB2, MET,*

RIT1, NRAS, RAF1, HRAS, ARAF, MAP2K1, o *SOS1*, la pérdida de función de NF1 o RASA1, la translocación de *ALK, ROS1, RET, MET*, o *NTRK2* y la amplificación de *EGFR, ERBB2, KRAS, MET, FGFR1*, o *MAPK*, dando todas ellas lugar a productos de señalización aberrantes y a la activación anómala de la vía molecular RAS/RAF/RTK.

En el caso de los adenocarcinomas que no presentan activación aberrante de la vía RAS/RAF/RTK se detectaron numerosas mutaciones en los genes supresores de tumores *P53, STK11, KEAP1* y *SMARCA4*. Dicha carga mutacional es significativamente superior que en el caso de los adenocarcinomas derivados de las mutaciones de oncogenes.

La detección de estas alteraciones y de sus productos derivados ha permitido establecer dianas terapéuticas directas sobre las que se desarrollan los llamados fármacos o terapias dirigidas. Del mismo modo, conocer el mecanismo de actuación exacto del fármaco ha permitido detectar las vías de resistencia al mismo. De estos fármacos se han beneficiado principalmente los pacientes con adenocarcinomas cuyo desarrollo es dependiente de la vía RAS/RAF/RTK en los que la esperanza de vida se ha visto aumentada significativamente; para el resto de los pacientes, la terapia de elección es la combinación de un doblete de platino e inmunoterapia. La frecuencia alélica de estas variaciones estructurales de los genes es dependiente de la población que se esté estudiando, suponiendo una limitación en la estandarización del diagnóstico y del tratamiento (53,54,55,56). Uno de los genes que más variación presenta de una población con respecto a otra es *EGFR*; alterado en un 10% en caucásicos frente a un 50% en asiáticos. (47)

Como se ha explicado, la secuenciación de genoma completo es una herramienta con un alto potencial diagnóstico y con implicación terapéutica, así como un buen factor predictivo de la evolución del adenocarcinoma de pulmón. La secuenciación de genoma completo se está consolidando como prueba molecular de elección en la práctica clínica en pacientes con adenocarcinoma de pulmón frente a técnicas como la inmunohistoquímica o la hibridación in situ fluorescente que solamente permiten la identificación de una alteración por muestra de tejido analizada. Sin embargo, el alto coste y la complejidad en la interpretación de resultados suponen un reto en la aplicación clínica de esta técnica, y en ocasiones se limita su uso a pacientes en estadios avanzados o que han fracasado a las líneas de tratamiento estándar. (57)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con el fin de identificar la relación coste-efectiva de implementar la secuenciación de genoma completo en la práctica clínica frente a las técnicas de análisis moleculares clásicas, estudios como el de Simons et al. (2021) han puesto de manifiesto que la NGS podría ser la técnica de análisis molecular de elección cuando su precio de realización sea menor y el coste del tratamiento dirigido también sea menor que el tratamiento estándar o significativamente más beneficioso para el paciente. (57, 58)

Mientras que la secuenciación completa del genoma se lleva a cabo a través del DNA, también se puede obtener numerosa información sobre las mutaciones de los genes y sus productos a través de la secuenciación del RNA. En términos generales, el RNA es la molécula encargada de copiar la información contenida en el DNA de tal forma que pueda ser posible su expresión en proteínas. Dependiendo de la función que desempeñen dentro de este proceso general, distinguimos los siguientes tipos de RNA (59):

- RNA mensajero (mRNA): se sintetiza en el núcleo celular a partir del DNA. Su función es trasladar las copias del DNA a los ribosomas para que se traduzcan a proteínas (traducción).
- RNA de transferencia: Su función es transportar aminoácidos específicos hasta los ribosomas para conseguir completar ese proceso de traducción.
- RNA ribosómico (rRNA): es el más abundante y el rRNA unido a proteínas forma los ribosomas, orgánulos encargados de la traducción.
- RNA nucleolar (nRNA): se origina a partir de diferentes segmentos de DNA denominados región organizadora nucleolar. Una vez formado el nRNA se fragmenta y da lugar a los diferentes rRNA.

También, podemos encontrar sRNA no codificantes como son (59):

- RNA largo no codificante (lncRNA): RNA de 200 nucleótidos. Regulan la modificación epigenética principalmente en el núcleo.
- Small RNA: longitud inferior a 200 nucleótidos. Desempeñan funciones importantes en procesos celulares como la diferenciación celular, proliferación, migración, apoptosis… Dentro de este último tenemos:
  - Micro RNA (miRNA): contienen alrededor de 22 nucleótidos. Regulan la expresión génica a nivel postranscripcional.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- RNA asociados a Piwi (piRNA): implicado en el desarrollo embrionario, mantenimiento de la integridad del DNA de la línea germinal, silenciamiento de la transcripción de transposones.

La detección de una alteración en cualquiera de estos tipos de RNA supone el hallazgo de un potencial biomarcador y de una diana terapéutica.

Dado que el adenocarcinoma es el tipo de tumor más incidente dentro de los tumores de pulmón, son numerosos los trabajos que se han publicado acerca del papel del RNA en el desarrollo de esta patología. Así, Smolander et al. (2019), secuenciaron el RNA codificante y no codificante de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, concluyendo que a nivel diagnóstico el RNA no codificante tiene el mismo potencial que ya se había demostrado para el RNA codificante. (60)

Con estos antecedentes Fan et al. (2018) y Zhao et al. (2018) establecieron la relación entre los niveles de lncRNAs, miRNAs y mRNAs con el estadio patológico del tumor, el hábito tabáquico o el sexo. También, se ha explorado la correlación entre estos niveles y la actividad de las vías de señalización encargadas de la división y muerte celular. Así niveles reducidos de miRNA Hsa-miR-486–5p podrían propiciar la división celular descontrolada en algunos tumores. (61,62)

Así mismo, se han identificado lncRNA, miRNA y mRNA relacionados con el pronóstico de la enfermedad y la resistencia a la quimioterapia. De entre estos RNA relacionados con el pronóstico, se ha evidenciado que hsa-miR-96-INA o hsa-miR-339–3p están implicados en el proceso de supresión de tumores, mientras hsa-miR-96-RGS20, SFTA1P-hsa-miR-204-RGS20, presentan la función opuesta. Algunos de ellos son detectables hasta diez años antes de que se manifiesten los primeros síntomas de la enfermedad, otros (hsa-miR-574–5p o LINC00472) son indicadores claros del proceso de transformación celular epitelio-mesenquimal. (61,62, 63,64,65) En lo que respecta al tratamiento, se ha visto aumentada la expresión de miRNA 601 and miRNA 596 en aquellos pacientes cuya enfermedad progresa tras la quimioterapia, mientras que estosse han presentado disminuidos en pacientes que han obtenido respuesta parcial al tratamiento. (66)

USC
DE COMPOSTELA

Conocer que gen está detrás de cada segmento de RNA es una tarea compleja, por lo que para establecer una relación entre ellos es necesario el estudio de los tumores a través de diferentes técnicas. (67) De este modo al secuenciar conjuntamente RNA y

DNA se ha podido establecer una relación entre el aumento de la expresión de RNA codificante y la presencia de mutaciones somáticas en los genes *KRAS, EGFR, NTRK3, KDR, PDGFRA, BRAF, ROS1, ALK, NTRK2, RET, PDGFRB, MET, NTRK1, ERBB2, FGFR1*. (68)

La capacidad de la técnica de secuenciación de RNA como técnica individual para arrojar datos relevantes a nivel diagnóstico, evolutivo y predictivo, así como su capacidad de ser realizada con alta eficiencia y fiabilidad no solo en muestras de tejido sino de suero sanguíneo la convierte en la técnica de elección para instaurarse dentro de la práctica clínica habitual. Sin embargo, debido a lo novedoso de esta técnica es recomendable emplearla de forma conjunta con otras, proporcionando datos de alta calidad especialmente al hacerlo con análisis proteómicos.

Las técnicas proteómicas permiten la cuantificación y caracterización de las proteínas contenidas en fluidos o en tejido humano. La diferencia relativa en la abundancia de una o varias proteínas entre un sujeto sano y un sujeto con adenocarcinoma de pulmón, es una rica fuente de información sobre las interacciones moleculares y vías de señalización de esta patología. Las proteínas son la última expresión del proceso biológico de expresión génica, aunque pueden verse modificadas por factores tales como el ambiente o los tratamientos farmacológicos entre otros. El alto dinamismo de estas macromoléculas dificulta enormemente su estudio, aunque su identificación permite identificar vías moleculares de alto valor diagnóstico y pronostico, así como aquellas que median en la resistencia farmacológica. (69)

La aplicación de técnicas proteómicas para el estudio del adenocarcinoma de pulmón ha permitido no solo caracterizar y validar marcadores diagnósticos como son los genes *ERO1L, NARS, PABPC4, RCC1, RPS25* o *TRAS*, sino que también ha permitido identificar biomarcadores asociados a metástasis ganglionares (ERO1L o NARS) cuya sobreexpresión está directamente relacionada con una peor evolución de la patología. Así mismo, el estudio del proteoma ha permitido la clasificación del adenocarcinomadel estadio IA al IIIA proponiendo proteínas como la α-2-Macroglobulina, α-1-Macroglobulina o la α-1-antitripsina como potenciales biomarcadores de enfermedad temprana, así como el panel diagnóstico compuesto por los genes *CDKN2A, CX3CR1, COX4I2, SLC15A2* y *TFRC* entre otros. Finalmente, las técnicas proteómicas avanzadas han permitido identificar marcadores de resistencia a tratamientos como el paclitaxel (aumento de PDCD4). (69, 70,71)

Las fosfoproteínas tienen implicación directa en los procesos de división, señalización y apoptosis. Un ejemplo de estas fosfoproteínas son HSP90AB1, GFPT1, o CLIC implicadas en la vía PI3K/AKT/mTOR. El estudio comparativo del proteoma y del fosfoproteoma señala las mismas proteínas implicadas en las principales víasoncogénicas del adenocarcinoma de pulmón. (72)

No obstante, aunque el verdadero potencial de la identificación y clasificación de las proteínas se presenta cuando los datos se combinan con los obtenidos mediante el resto de técnicas de análisis multiómicas, el gran avance de las técnicas de análisis proteómicas han permitido obtener datos de alta calidad no solo en tejido sino en suero sanguíneo, muestras obtenidas por BAL o aliento, es decir, en muestras obtenidas por técnicas mínimamente invasivas, lo que las convierte en biomoléculas de gran interés clínico. (73)

Los análisis multiómicos proporcionan una mejora en la capacidad diagnóstica, pronóstica y terapéutica frente a las técnicas clásicas, no obstante, actualmente no se ha validado ningún marcador para su empleo clínico como método de diagnóstico en solitario. Por este motivo, los esfuerzos deben ir dirigidos hacia el refinamiento de estas técnicas, así como de los métodos computacionales de análisis e interpretación digital que permita la validación operacional de las mismas, proporcionando como resultado último la implantación de la medicina personalizada en los centros sanitarios. (74,75)

2.5. Anatomía e histología: adenocarcinoma colorrectal

El intestino grueso es la parte final del aparato digestivo ubicado dentro de la cavidad abdominal con una longitud aproximada de 1,5 metros. Anatómicamente está conformado por ciego y apéndice vermiforme, colon ascendente, colon transverso,colon descendente, colon sigmoide, recto y canal anal. Tanto el colon como el recto están constituidos por varias capas de tejido siendo la más interna la mucosa, que se encuentra rodeada por la submucosa, esta a su vez por la capa muscular y finalmente encontraríamos la capa serosa en la parte más externa. La función principal de este órgano es absorber agua y nutrientes minerales de los alimentos, así como de área de almacenamiento de las heces. Para que este proceso se lleve a cabo, la capa mucosa constituida por tejido glandular secretor verterá moco al tracto digestivo permitiendo la movilización de las heces. (43)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

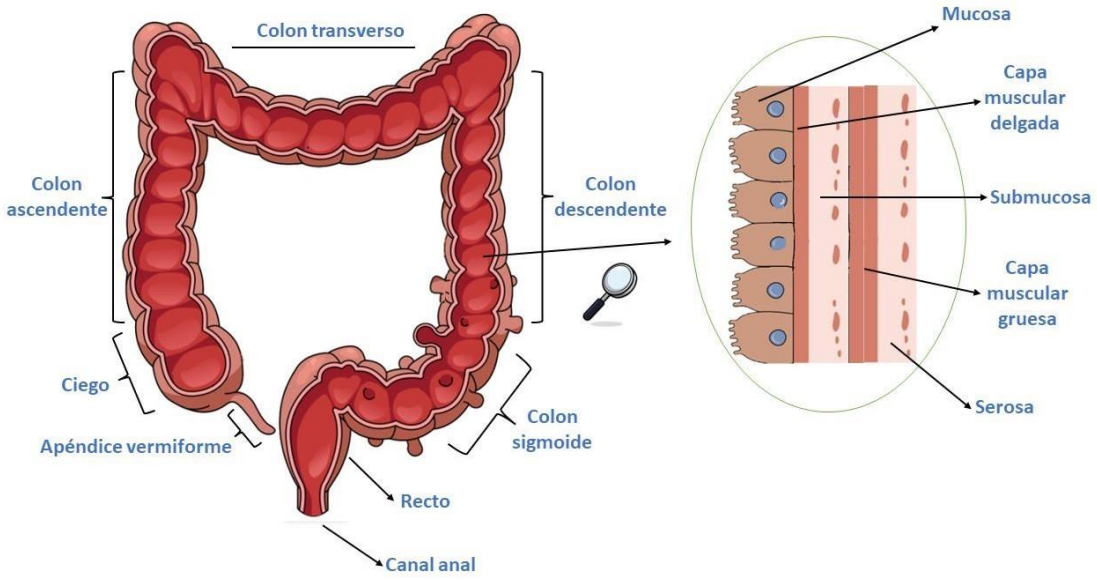


Figura 7. Anatomía del colon

En cuanto a la irrigación e inervación, el colon y el recto reciben su irrigación principalmente de las ramas cólicas de las arterias mesentéricas superior e inferior, y su inervación a través del sistema nervioso entérico (plexos de Meissner y Auerbach) y sistema nervioso parasimpático (aórtico, celíaco, mesentérico superior, mesentérico inferior y plexos nerviosos hipogástricos). (43)

Los adenocarcinomas colorrectales son aquellos que se originan en el tejido epitelial que conforma la capa mucosa del colon y el recto. (76) Su diagnóstico histológico, se lleva a cabo principalmente a través de la obtención de una biopsia mediante colonoscopia.

Dentro de los adenocarcinomas colorrectales encontramos dos subcategorías:

- Adenocarcinoma mucinoso: se caracteriza por presentar en al menos un 50% de su volumen mucina extracelular. Representa aproximadamente entre el 10-20% de los CRC. Se diagnostica principalmente en el colon proximal. (76)
- Adenocarcinoma de células de anillo en sello: histología poco frecuente que se caracteriza por la presencia de mucina intracitoplasmática que empuja el núcleo hacia la periferia en al menos el 50% de las células que conforman el tumor. (77)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En lo que respecta a los criterios de invasión y desdiferenciación celular, estos son compartidos con los ya mencionados anteriormente para el adenocarcinoma de pulmón (ver sección 2.1)

Las técnicas inmunohistoquímicas para poder concretar con exactitud la histología, el nivel de invasión, así como el grado de los adenocarcinomas colorrectales serán cruciales en el apoyo al diagnóstico. Así pues, para confirmar la histología, los tumores deberán presentar positividad para el marcador CK20 (indicador de origen colorrectal) y negatividad o baja expresión para el CK7 (típicamente expresada en adenocarcinomasde ovario, endometrio o pulmón). La ausencia de positividad para CK20 está relacionada con la inestabilidad de microsatélites y en consecuencia con un peor pronóstico. El marcador CDX2 es también indicador de diferenciación entérica y presenta positividad en más del 90% de los adenocarcinomas colorrectales. (78)

La positividad del marcador SPARC sirve para identificar invasión linfovascular. Otros marcadores como CD44 o CD133 también serán de ayuda en la determinación de invasión linfovascular y posible metástasis a distancia. (79)

2.6. Test diagnósticos en adenocarcinoma colorrectal

Una vez identificada la sospecha, el diagnóstico del adenocarcinoma colorrectal se completará mediante la realización de pruebas radiodiagnósticas, la identificación de marcadores tumorales en suero sanguíneo, la realización de una biopsia de la lesión y el examen clínico de signos y síntomas.

Las pruebas de imagen en el adenocarcinoma colorrectal se utilizan como herramienta complementaria a la colonoscopia óptica ya que su fiabilidad es limitada en tumores inferiores a los 3-5 cm. Entre las pruebas de elección se encuentran el CT (especialmente para el cáncer de colon) y la MRI (especialmente para el cáncer de recto) capaces de identificar el componente mucinoso del tumor, así como su localización y tamaño. Las principales limitaciones de estas técnicas son la dificultad para determinar tanto la profundidad de la invasión tumoral como la presencia deadenopatías metastásicas. El PET-CT aporta información sobre la extensión del tumor (invasión locorregional o a distancia). (80,81)

Otra técnica novedosa y poco invasiva es la elastografía, capaz de identificar la pared elástica del colon sano y la pared y/o estructura con mayor rigidez que suele ser

consecuencia de la presencia de una masa tumoral. Finalmente, en lo que a las técnicas de imagen respecta cabe destacar que la unión de las imágenes obtenidas por CT y MRI a través de procesos de *"maching learning"* ha permitido la obtención de imágenes 3D llamadas colonoscopia virtual que pueden sustituir a la colonoscopia tradicional. (80)

Pese a los grandes avances acontecidos en el campo radiológico, la técnica de elección para el diagnóstico del adenocarcinoma colorrectal sigue siendo la colonoscopia óptica. A través de la colonoscopia se obtiene una imagen completa del colon al mismo tiempo que permite extraer muestras y/o marcar lesiones sospechosas para su posterior estudio. Numerosos estudios han evidenciado un riesgo menor de padecer CRC a los10 años en pacientes que se sometieron a una colonoscopia óptica como método diagnóstico que en aquellos que no lo hicieron. No obstante, al ser una técnica invasiva aquellos pacientes que no deseen o no sean candidatos a someterse a la misma tienen en la colonoscopia virtual una alternativa. (82)

En cuanto a los marcadores tumorales en suero sanguíneo, los más comunes son el CEA y el CA 19-9. Ninguno de ellos puede ser empleado en solitario para el diagnóstico del adenocarcinoma de CRC, pero si son útiles (especialmente el CEA) para monitorizar la enfermedad, ya que su sobreexpresión se ha puesto en relación con la supresión de los procesos de diferenciación celular o con la inhibición de la apoptosis celular entre otros. (83)

Finalmente, ninguna de las pruebas anteriormente mencionadas tendría sentido sin la realización de un examen clínico de los signos y síntomas. Algunos de los más frecuentes se relacionan directamente con el cambio de hábitos del patrón intestinal, apareciendo episodios diarreicos o de estreñimiento, cambios en la consistencia de las heces o sangrado rectal. Las molestias abdominales tales como calambres, flatulencias odolor difuso son algunos de los síntomas más reportados por los pacientes junto con debilidad y pérdida de peso. Estos síntomas suelen aparecer en fases avanzadas de la enfermedad y usualmente son comunes a otras patologías por lo que una correctaanamnesis y rápida derivación a los circuitos de detección precoz por parte del facultativo será determinante en el pronóstico del paciente. (45)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.7. Estadificación del adenocarcinoma colorrectal

En los adenocarcinomas colorrectales, al igual que en los adenocarcinomas de pulmón, se emplea el sistema de estadificación TNM del "*American Joint Committee on Cancer*" (AJCC) 8ª edición (versión de 2018) para determinar el estadio en la que se encuentra el tumor. (84)

De igual modo que ocurría con del adenocarcinoma de pulmón, un diagnóstico temprano dará lugar a un mejor pronóstico.

.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2. Estadificación TNM del cáncer de colorrectal. Adaptado de la guía de la AJCC 8ª edición (versión de 2018)

Estadio	T	N	M	Descripción
0	Tis	N0	M0	El cáncer se encuentra en su etapa más temprana. Esta etapa también se conoce como carcinoma in situ o carcinoma intramucoso (Tis). No ha crecido más allá de la capa interna (mucosa) del colon o del recto.
I	T1/2	N0	M0	El cáncer ha crecido a través de la capa muscular de la mucosa (muscularis mucosae) hasta la submucosa (T1), y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIA	T3	N0	M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto, pero no ha atravesado estas capas (T3). No ha alcanzado órganos adyacentes. No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIB	T4a	N0	M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto, pero no ha crecido hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4a). El cáncer aún no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIIC	T4b	N0	M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4b). El cáncer aún no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIIA	T1/2	N1/1c	M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). Se propagó a entre 1 y 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1) o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos, pero no a los ganglios en sí (N1c). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T1	N2a	M0	El cáncer ha atravesado la mucosa hasta la submucosa (T1). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IIIB	T3/4ª	N1/1c	M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto (T3), o a través del peritoneo visceral (T4a), pero no ha alcanzado los órganos adyacentes. Se propagó a entre 1 y 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1a o N1b) o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos, pero no a los ganglios en sí (N1c). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T2 /3	N2a	M0	El cáncer ha crecido hacia la muscular propia (T2) o hacia las capas más externas del colon o del recto (T3). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T1/2	N2b	M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). Se propagó a siete o más ganglios linfáticos adyacentes (N2b). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IIIC	T4a	N2a	M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto (incluyendo el peritoneo visceral), pero no ha alcanzado los órganos adyacentes (T4a). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T3/4ª	N2b	M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto (T3), o a través del peritoneo visceral (T4a), pero no ha alcanzado los órganos adyacentes. Se propagó a siete o más ganglios linfáticos adyacentes (N2b). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T4a	N1/2	M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4b). Se propagó por lo menos a un ganglio linfático cercano o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos (N1 o N2). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes. (Cualquier N). El cáncer se propagó a un órgano distante (tal como el hígado o el pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero no se ha propagado a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal) (M1a).
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). El cáncer se propagó a más de un órgano distante (tal como el hígado o el pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero no se ha propagado a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal) (M1b).
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). Se ha propagado a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal) y puede o no haberse propagado a órganos o a ganglios linfáticos distantes (M1c).

2.8. Nuevas técnicas para el diagnóstico del adenocarcinoma colorrectal

Siguiendo la misma línea argumental presentada para el adenocarcinoma de pulmón (ver apartado 2.4), los esfuerzos para aumentar el campo de conocimiento sobre el comportamiento de los adenocarcinomas colorrectales se centran nuevamente en el desarrollo de las técnicas moleculares multiómicas.

El adenocarcinoma colorrectal es una enfermedad que se origina principalmente a partir de dos vías génicas; la vía supresora o de inestabilidad genómica y la vía de inestabilidad de microsatélites. El modelo de inestabilidad genómica propuesto porAfanador et al. (2022) se basa en la inactivación por acumulación de mutaciones del gensupresor de tumores *APC* siendo el responsable de aproximadamente el 85% de los adenocarcinomas colorrectales esporádicos y del 15% de los heredables. Cuando se produce una mutación en el gen supresor de tumores *APC* (caracterizada en ratones enel codón 1628), este da lugar a una proteína aberrante en su extremo carboxi-terminal encargado del mantenimiento de la estabilidad cromosómica durante la mitosis celular. Esta proteína aberrante no inducirá la degradación de ß-catenina que se translocará al núcleo activando la producción de oncoproteínas que favorecerá la ganancia de mutaciones en otros genes como son los oncogenes *KRAS, NRAS, BRAF* o *SMAD4*, generando una sobreexpresión de su función. También favorecerá la supresión de la fusión de los genes de tumores *DCC* y *P53* dando lugar a la inhibición del proceso de apoptosis y a la proliferación del adenocarcinoma colorrectal. (85,86)

Por su parte, el modelo de inestabilidad de microsatélites está relacionado con las mutaciones de los genes del sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR) siendo estos: *MLH1, MSH2, MSH6, PMS1* y *PMS2*. En los adenocarcinomas colorrectales esporádicos la inestabilidad de microsatélites se presenta en un 15-20% de los casos, mientras que en los heredables lo hace hasta en un 90%. Ambas vías pueden aparecer conjuntamente siendo el patrón más frecuente la presencia de inestabilidad de microsatélites y mutación del gen *BRAF* en los tumores del colon proximal; baja inestabilidad de microsatélites y mutaciones de los genes *APC* y *P53* en los tumores del colon distal y baja o ausencia inestabilidad de microsatélites con *BRAF* nativo en los tumores que se presentan en el recto. La carga mutacional tumoral total suele ser más elevada en tumores que presentan inestabilidad de microsatélites que en los que no lo hacen. (87,88,89)

USC DE COMPOSTELA

La secuenciación masiva ha permitido ahondar en los mecanismos de producción de estas mutaciones ayudando a tipificarlas con una cantidad de material tumoral muy pequeña y en un único análisis. De este modo, hoy sabemos que el gen *APC* es el que más eventos de tipo indel presenta en tumores con estabilidad de microsatélites intacta. También se determinó la presencia de mutaciones somáticas frecuentes en los genes *APC* (exón 15; región MCR), *KRAS* (exones 2 y 3), *P53* (exones 5-8) y de V600E en el exón 15 del gen *BRAF*. La aplicación de esta técnica también puede utilizarse en líneas celulares como NCI-H716 mediante la cual se observó por primera vez el gen *FGFR2* mutado en los adenocarcinomas colorrectales. *FGFR2* induce la sobreexpresión dePDL-1 a través de la vía de señalización JACK/STAT3 que induce a su vez la apoptosis de las células T, abriendo una nueva vía terapéutica a través de los fármacos anti-FGFR y anti-PDL1 ya existentes para otras patologías tumorales. Esto mismo ocurre cuandolos tumores presentan amplificación para *HER2*. (90, 91,92)

Finalmente, la secuenciación de genoma completo ha permitido detectar la presencia de fusión génica especialmente en presencia de los genes *NTRK1,2* y *3*, *ALK*, *ROS1* y *RET*. El patrón de aparición de fusiones de genes oncogénicos aparece especialmente en un grupo de pacientes cuyos tumores presentan deficiencia de la proteína reparadora MLH1, metilación de promotor de MLH-1 y en los que los genes *BRAF* y *KRAS* no se encuentran mutados. La fusión de genes es un evento de muy baja aparición en losCRC, pero de gran valor terapéutico al ser las proteínas de fusión resultantes una buena diana farmacológica. (93)

El estudio del DNA se complementa mediante el empleo de otras técnicas como la secuenciación de RNA. Estudios como los de Koduru et al. (2017) y Chen et (2019) al han analizado el transcriptoma de muestras de tejido sano, tumoral y tumoral metastásico con el fin de establecer marcadores diagnósticos y pronósticos, así como posibles dianas terapéuticas. Dichos análisis han puesto de manifiesto el aumento en la expresión de los miRnas proto-oncogénicos miR-9, miR-17, miR-20, miR-21, miR-31, miR-92a, miR-96, miR-135, miR-141, miR-155, miR-205, miR-214, miR-224, miR-372 y miR-708. Por ejemplo, miR-21 promueve la proliferación y metástasis del CRC al inhibir la función de genes supresores de tumores como *PDCD4* entre otros; miR-92a también se ha visto relacionado con el proceso de transición EMT al inhibir la expresión de E-cadherina, así como miR-224 al modular el gen *SMAD*. Cabe destacar también la función inhibidora de la actividad del gen *P53* mediada por miR-96. (94,95)

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En las fases más avanzadas de la enfermedad han puesto de manifiesto la presencia disminuida de miR-1 y aumentada de miR-31, miR-183, miR-135b, miR224 y miR-584.

Por otro lado, se ha visto disminuida la expresión en adenocarcinomas colorrectales de los miRNAs supresores de tumores miR-7, miR-18a, miR-26b, miR-27b, miR-34a, miR-101, miR-125, miR-135a/b, miR-138, miR-143, miR-144, miR-145, miR-194, miR-195, miR-320a, miR-365 y miR-491. De entre ellos, cobran especial interés miR-143 y miR-18a al inhibir la expresión del gen *RAS* o miR-135a/b que inhibe la expresión del gen *APC*.

Todos estos miRNAs están implicados directamente en los procesos celulares de regulación, proliferación, angiogénesis y migración. Así mismo, se ha visto aumentada la expresión de los piRNAs piR-hsa-25447 y piR-hsa-23992 en el proceso de progresióny metástasis tumoral, aunque estos se elevan en fases más tempranas de la enfermedad que los miRNAs, convirtiéndose en excelentes marcadores pronósticos y de evolución de la enfermedad.

Los incRNAs son tejidos específicos, por lo que su identificación será de gran relevancia en la caracterización precoz del adenocarcinoma colorrectal. Los incRNAs que presentaron una mayor expresión en el tejido tumoral frente al tejido sano fueron lnc-SLC47A1-3:1, lnc-RABGGTB-1:6, lnc-RPL17-2:4 y lnc-HHIPL1-3:1, siendo los menos expresados nc-ABHD3-1:4, lnc-ABHD3-1:2, lnc-ZNF860-1:1y lnc-PCYOX1L- 2:15.

Conocer los procesos reguladores del comportamiento de los adenocarcinomas colorrectales a través de biomoléculas presentes tanto en tejido como en sangre es de gran ayuda a la hora de agilizar y optimizar los procesos diagnósticos, así como de establecer el tratamiento más adecuado. No obstante, teniendo en cuenta que el productofinal de la expresión génica son las proteínas, a todas las técnicas anteriormente nombradas, pero especialmente a la transcriptómica debemos sumar los análisis proteómicos para lograr una visión global y lo más completa posible de las características y comportamiento del tumor. (94,95)

El proteoma, no solo es diverso entre células normales, sino que también lo es entre las células tumorales que conforman un mismo tipo de tumor. Algunas proteínas como ITGA3 se encuentra elevada en tumores del colon derecho, mientras NOX4 lo hace en tumores del colon izquierdo; estas a su vez, han demostrado ser un buen indicador de

USC DE COMPOSTELA

recaída de la enfermedad. Por su parte, las proteínas CADM1, LGALS3BP, HYOU1, FN1, VTN, LRG1 y MRC2 han demostrado evidencia suficiente para convertirse en marcadores de localización colorrectal de tumores y las proteínas ANP32B, G6PD, RCN1 lo han hecho para indicar que el tumor es un adenocarcinoma. (96.97,98,99)

En lo que respecta al estadio tumoral, las proteínas MCM5, TIMP-1, DNMT1 y LCN2 indicarán un estadio temprano de la enfermedad. Por su parte, serán las proteínas PTPRJ, PIGR, CFH, F5, FGG, VTN, IGHG2, ITIH4 y FETUB las que nos indiquen un estadio localmente avanzado y/o metastásico. (96,97,98,99)

El estudio del proteoma también nos sirve de indicador predictivo de la respuesta que puede tener un paciente a un determinado tratamiento; así, por ejemplo, la presencia de niveles elevados de la proteína pEGFR se han visto relacionados con sensibilidad al tratamiento con cetuximab. La proteína estrella en lo que al pronóstico se refiere sigue siendo el CEA, aunque su baja especificidad hace necesario hallar nuevos marcadores pronósticos. En este terreno, la proteína EBI1 está ganando relevancia al haberse visto implicada en el proceso de transformación adenoma-carcinoma. (96, 97,98,99)

El estudio del fosfoproteoma, está tomando especial interés en el estudio de los CRCs. Las fosforilaciones o desfosforilaciones son los cambios post-trancripcionales más frecuentes. Éstos tienen la capacidad de activar o inhibir vías completas de señalización por lo que su identificación podría revelar la relación entre estos procesos y los mecanismos carcinogénicos. El estudio global del fosfoproteoma en este tipo de neoplasias ha revelado sitios de fosforilación en proteínas asociadas a la apoptosis y en otras involucradas en la regulación de la transducción de señales celulares, incluidas las quinasas y sus sustratos. También ha permitido hipotetizar acerca de los mecanismos de resistencia a fármacos como el 5-FU caso que podría estar mediado por la fosforilación de HSPB1. (96,97,98,99)

Por otra parte, el conocimiento del proteoma ha permitido identificar marcadores que permiten caracterizar las células madre tumorales, siendo el más representativo CD66c. (99). En resumen, el estudio del proteoma se ha convertido en una estrategia excelente para el establecimiento de nuevas dianas terapéuticas dirigiéndose actualmente los esfuerzos de la comunidad científica a la validación de estos marcadores y a su implementación como método diagnóstico precoz en sangre previamente a larealización de la colonoscopia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Tratamiento

3.1. Tratamiento del adenocarcinoma de pulmón

Los recursos terapéuticos para el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón son variados. La selección del tratamiento para cada paciente se basará en los siguientes criterios: estadio tumoral, estado funcional del paciente (PS), probabilidad de recaída, comorbilidades, edad, evolución de la enfermedad, elección del paciente y/o recursos disponibles entre otros.

Para los adenocarcinomas de pulmón en estadio I el tratamiento de elección será la cirugía (lobectomía, resección en manga, segmentectomía o resección en cuña) incluyendo linfadenectomía. Tras la cirugía, el oncólogo decidirá si es necesario completar el tratamiento con radioterapia o quimioterapia siendo el empleo de osimertinib adyuvante en pacientes con *EGFR* mutado el tratamiento recomendado en estadio IB.

LA SBRT es una alternativa en el tratamiento de tumores que se consideren inoperables, por ejemplo, por mala función pulmonar, o cuando el paciente rechaza la intervención. La ablación por radiofrecuencia también será una opción cuando el tumor sea muy pequeño y esté situado en la parte externa del pulmón. (100, 101,102)

Los tumores en estadio II también tendrán como primer tratamiento de elección la cirugía. Aunque estos tumores son de mayor tamaño, siempre se primará respetar la mayor cantidad posible de parénquima (segmentectomía o lobectomía intentando evitar la neumonectomía). Opuestamente a los tumores en estadio I, en este caso es muy recomendable administrar terapia adyuvante tras la cirugía, aunque los márgenes quirúrgicos estén libres de enfermedad. El tratamiento neoadyuvante consistirá en quimioterapia seguida de inmunoterapia con nivolumab o nivolumab en combinación con ipilimumab o bien en quimiorradioterapia. Para aquellos pacientes que no puedan someterse a cirugía el tratamiento de elección es la radioterapia en monoterapia. (102)

En el caso de los adenocarcinomas de pulmón diagnosticados en estadio IIIA, es decir, que presentan enfermedad localmente avanzada, el tratamiento más efectivo será la combinación de quimioterapia, radioterapia y/o cirugía. Estos casos debido a su gran complejidad requerirán de la opinión de un comité multidisciplinar capaz de valorar el tratamiento y secuencia más adecuados basándose en el tamaño, nivel de afectación de los ganglios linfáticos, condición basal del paciente y tolerancia al tratamiento. En

algunos casos se administrará quimiorradioterapia en combinación con nivolumab seguida de cirugía o radioquimioterapia con intención radical seguida por durvalumabde mantenimiento en pacientes con PD-L1 ≥ 1%. Tras la cirugía puede considerarse tratamiento adyuvante con osimertinib en aquellos pacientes que presenten mutación en el gen *EGFR* o atezolizumab en los pacientes con PD-L1 ≥ 50% (en aquellos que no recibieron inmunoterapia en adyuvancia). (102)

En el estadio IIIB la cirugía no suele ser una opción terapéutica debido a la amplia extensión de la enfermedad, aunque todavía a nivel locorregional. En este caso, el tratamiento de elección será la quimiorradioterapia seguida de inmunoterapia con durvalumab de mantenimiento durante un año en los pacientes con expresión de PD-L1 ≥ 1%. (102)

Cuando el tumor es diagnosticado en estadios IIIC-IV la intención del tratamiento será paliativa, es decir, tendrá el ánimo de aliviar los síntomas de la enfermedad y/o frenar su propagación. En estos casos el tratamiento dependerá de los órganos a los que se haya extendido la enfermedad, si las células tumorales presentan alteraciones y la condición general del paciente. Cuando el cáncer se haya propagado a un solo lugar se tratará la lesión a distancia preferiblemente con radioterapia y/o cirugía mientras que el tratamiento a nivel pulmonar se llevará a cabo dependiendo de las etapas T y N. En cualquier caso, es aconsejable realizar pruebas para identificar mutaciones genéticas como por ejemplo las de los genes *EGFR, ALK, ROS1, BRAF, RET, MET, KRAS* o *NTRK*. (103, 104, 105) Cuando se identifique alguna alteración es recomendable elegir como tratamiento en primera línea un medicamento de terapia dirigida:

- Mutación en *EGFR*: inhibidor de EGFR (osimertinib, erlotinib, afatinib, gefitinib, dacomitinib)
- Traslocación de *ALK*: inhibidor de ALK (crizotinib, ceritinib, alectinib, brigatinib y lorlatinib). Si fracaso inhibidor de ALK en segunda línea.
- Traslocación de *ROS1*: inhibidor de ROS1 y ALK (crizotinib, ceritinib, lorlatinib, entrectinib).
- Mutación en *BRAF*: inhibidor de BRAF o MEK (dabrafenib y trametinib).
- Fusión de *RET*: inhibidores de RET (selpercatinib y pralsetinib).
- Alteraciones de *MET*: inhibidores de MET (capmatinib y tepotinib).
- Mutación en *KRAS*: inhibidor de KRAS (sotorasib y adagrasib).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Traslocación de *NTRK*: inhibidores de NTRK (larotrectinib y enrtectinib).

Otros fármacos dirigidos utilizados en el tratamiento del cáncer de pulmón son los antiangiogénicos como el bevacizumab o el ramucirumab.

En aquellos tumores que la expresión de la proteína PDL-1 sea superior al 50% (en el tejido tumoral) la inmunoterapia en monoterapia es una opción de tratamiento. En los casos en los que la expresión de PD-L1 se sitúa entre el 0 y el 49% se puede utilizar la combinación de quimioterapia y anti-PD-1 o PD-L1, quimioterapia + anti PD-1 y antiCTLA4 o doblete de inmunoterapia (anti PD-1 y anti CTLA4).

Tabla 3. Clasificación de los fármacos inmunoterápicos para el cáncer de pulmón según su diana terapéutica

Diana Terapéutica	Fármaco
anti PD-1	• Pembrolizumab • Nivolumab • Cemiplimab
anti PD-L1	• Atezolizumab • Avelumab • Durvalumab
anti CTLA4	• Ipilimumab • Tremelimumab
anti LAG-3	• Relatlimab

Cuando la enfermedad progresa o recurre, las siguientes líneas de tratamiento dependerán de la localización, extensión de la enfermedad, tratamientos previamente empleados, tiempo libre de progresión, del estado de salud general del paciente y de los tratamientos disponibles. En este momento, el conocimiento del comportamiento de las células tumorales, así como de las alteraciones de los oncogenes y genes supresores de tumores es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos capaces de aportar nuevas opciones terapéuticas.

3.1.1. Vigilancia activa

La vigilancia activa es un recurso terapéutico de gran utilidad para evitar el sobretratamiento en pacientes cuyos tumores no limitan la esperanza de vida del paciente. La vigilancia activa ha demostrado ser una técnica adecuada en pacientes con nódulos subsólidos premalignos donde el diámetro del componente sólido sea inferior a 5mm (Tis, T1a) con especial indicación en pacientes con comorbilidades que no

permiten la realización de una intervención quirúrgica o SBRT. Estudios como elllevado a cabo en Italia por Silva et al. (2018) han demostrado que realizando un seguimiento de estas lesiones mediante tomografía computarizada de baja dosis con unafrecuencia anual o bianual se puede reducir la mortalidad a largo plazo hasta en un 39%.En este mismo estudio, también se demostró que no hay diferencias en mortalidad ni progresión del adenocarcinoma de pulmón entre los pacientes que deciden someterse a una intervención quirúrgica y los que optan por la vigilancia activa en un periodo temporal de aproximadamente 10 años. Las conclusiones de dicho estudio fueron corroboradas por Pastorino et al. (2019) quienes comprobaron que no hay diferencias enmortalidad o aparición de la enfermedad en fases más avanzadas (II-IV) entre realizar elseguimiento de las lesiones premalignas anual o bianualmente. (106, 107, 108)

Por otra parte, Silva et al. (2018) establecieron que, ante la aparición o aumento del diámetro del componente sólido por encima de los 5mm, la duplicación del volumen del tumor en un periodo inferior a 600 días, la medida del valor máximo de consumo estándar (SuvMax) de la actividad metabólica de 18FDG-PET superior a 1.5 y/o el estudio patológico tras la obtención de una biopsia sea positivo, sí se recomendaría realizar una intervención quirúrgica y comenzar el tratamiento sistémico pertinente. (106)

La vigilancia activa también se emplea tras la intervención quirúrgica de los adenocarcinomas de pulmón en fases tempranas cuyos márgenes quirúrgicos estánlibres de enfermedad. Por el contrario, esta técnica no está recomendada en pacientes cuya enfermedad se encuentra en una fase avanzada. (109)

3.1.2. Cirugía

La cirugía, es el tratamiento estándar para los adenocarcinomas de pulmón en estadios tempranos. Este tratamiento tiene intención radical en sí mismo, aunque a veces se acompañe de otros tratamientos como son la quimioterapia, la radioterapia o de ambos. Su propósito principal es mejorar la supervivencia global y la calidad de vida del paciente.

Dependiendo de la localización y dimensión del tumor, así como del estado de salud general del paciente, el cirujano decidirá la cantidad de tejido que es necesario extirpar. Así pues, se resumen a continuación las principales opciones quirúrgicas para la extirpación del adenocarcinoma de pulmón (110):

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Resección en cuña o segmentectomía: indicada en tumores pequeños localizados en la parte más distal del pulmón. Consiste en la extirpación de una parte del lóbulo en forma de triángulo, por ello, también está indicada cuando la capacidad pulmonar del paciente no permita la resección completa del lóbulo. Actualmente se está incrementando el uso de la segmentectomía, con resultados en término de supervivencia similares a los de la lobectomía.
- Resección en manga: se realiza cuando el tumor invade alguna de las grandes vías respiratorias (ej. tráquea). El cirujano realizará un proceso de corte y empalme de la vía aérea que quedará acortada.
- Lobectomía: consiste en la extirpación completa del lóbulo pulmonar que contiene el tumor. Es la más practicada ya que es la técnica de la que se dispone de más información sobre los resultados a largo plazo.
- Neumonectomía: en esta cirugía se extirpa el pulmón por completo. Es la más arriesgada presentando una tasa de mortalidad de 3.2% y 6.2% a los 30 y 90 días tras la cirugía respectivamente. Esta técnica debe evitarse siempre que sea posible y se reserva solo para aquellos casos sin otra opción mejor. (111)

Habitualmente, estas resecciones se llevaban a cabo a través de un proceso quirúrgico llamado toracotomía que consiste en la apertura del tórax y da acceso al pulmón. Este proceso puede generar numerosos efectos secundarios, estando entre ellos la hemorragia, la formación de coágulos pulmonares, las infecciones de la incisión quirúrgica, la neumonía o el neumotórax entre otras. En los últimos años, con eldesarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, ha tomado gran popularidad el empleo de la cirugía toracoscópica mínimamente invasiva asistida por video (VATS por sus siglas en inglés). (111)

Mediante el empleo de esta técnica varios estudios han demostrado mejores tasas de mortalidad perioperatoria y supervivencia a largo plazo en comparación con pacientes operados mediante toracotomía. Así mismo, un gran estudio de cohorte retrospectiva europeo ha evidenciado una reducción en la mortalidad hospitalaria que pasa de un 1,9% en pacientes sometidos a cirugía abierta a un 1% en pacientes sometidos a VATS. Del mismo modo, se atestiguó un aumento de la supervivencia a los 5 años de un 15% yun descenso de un 2,6% en el riesgo total de sufrir algún evento adverso en VATS frente a la toracotomía. El tiempo de hospitalización también se vio reducido en aproximadamente cinco días. Esta técnica ha permitido que los cirujanos valoren en

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

mayor medida operar a pacientes de edad avanzada, suponiendo esto una nueva opción terapéutica para este grupo de edad. (112)

Pese a sus grandes ventajas, una de las principales limitaciones que presenta la cirugía mediante VATS es la escasez de movimientos, dificultando la realización de neumonectomías y linfadenectomías. Hattori et al. (2018) al igual que otros autores, han evidenciado la escasa diferencia entre la supervivencia a largo plazo en aquellos pacientes que se someten a linfadenectomía (aprox. 94%) frente a los que no lo hacen (92%). No obstante, ante la sospecha de micrometástasis se puso de manifiesto la necesidad de una técnica mínimamente invasiva que facilitase la extirpación de nódulos linfáticos. (112, 113)

Para sobreponerse a esta limitación, la comunidad científica ha desarrollado una nueva técnica quirúrgica mínimamente invasiva llamada cirugía torácica asistida por robot (RATS por sus siglas en inglés). El amplio rango de movimientos que permite el robot ha evidenciado en estudios como el de Yang et al. (2017) la mayor capacidad de esta técnica para realizar linfadenectomías y neumonectomías frente a VATS. En términos de comorbilidades asociadas no difiere en gran medida de los resultados presentados para VATS, aunque si ha demostrado ligeramente superioridad en términos de supervivencia a largo plazo, presentando aproximadamente un 77% frente a un 73% en VATS y 76% en cirugía abierta sin hacer distinción por estadio. (114,115)

Pese a que la RATS ha demostrado un menor tiempo de hospitalización (4 días frente a 5 VATS y 6 cirugía abierta), así como una mayor capacidad de extirpación de ganglios linfáticos, el porcentaje de comorbilidades asociada, así como el porcentaje de supervivencia a largo plazo no es estadísticamente significativa frente a la que presentan sus competidoras. Por el contrario, el coste de RATS es aproximadamente un 13% más elevado. (116)

La cirugía asistida por robot se implementó en EE.UU. y la UE en 2001, en Latinoamérica en 2006 y en Asia en 2009. Indudablemente, es necesario que la comunidad científica y los cirujanos continúen desarrollando y perfeccionando esta técnica, aunque por el momento la técnica quirúrgica de elección para la extirpación del adenocarcinoma de pulmón sigue siendo VATS atendiendo a criterios de coste y efectividad. (117)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.3. Radioterapia

La radioterapia, es una herramienta terapéutica muy utilizada en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón, tanto es así, que es la única que tiene alguna indicación en todas las fases de la enfermedad ya sea curativa o paliativa.

A través de los estudios de Tyldesley et al. y Delaney et al. mencionados en las publicaciones de Vinod et al. (2020) se establecieron los criterios para evaluar la indicación de esta técnica en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón. Estosestudios concluyeron evidenciando que aproximadamente el 77% de los pacientes que padecen esta enfermedad presentan evidencia constatada para recibir tratamiento radioterápico. (118,119)

La radiación terapéutica, puede ser administrada en dos modalidades, externa (EBRT) o interna (braquiterapia). Las técnicas de radioterapia externa incluyen la radioterapia estereotáctica (SBRT), la radioterapia tridimensional conformada (3D-CRT), la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) así como su variante volumétrica (VMAT) y la radiocirugía estereotáctica.

La técnica de elección actual en pacientes con adenocarcinoma de pulmón estadio I-IIA cuyos tumores no son operables o no quieren someterse a cirugía es la radioterapia estereotáctica, convirtiéndose en el tratamiento estandarizado tras haber demostrado superioridad en eficacia frente a la radioterapia externa convencional en los ensayos aleatorizados SPACE y CHISEL. (119)

La SBRT es una técnica de alta precisión que permite la radiación de lesiones localizadas con dosis altas o ablativas de radioterapia minimizando el daño en el tejido sano circundante y por ende causando un menor número de comorbilidades asociadas al tratamiento. Para ello, es crucial realizar una correcta planificación por imagen en la que se delimite el volumen y posición del tumor. Habitualmente, esta planificación serealiza por CT, aunque los últimos ensayos se posicionan a favor de la MRI al proporcionar una mejor calidad de imagen de los tejidos blandos. Por último, al ser el pulmón un órgano en movimiento se recomienda administrar la SBRT a través de técnicas moduladoras de intensidad como IMRT y VMAT para preservar la integridad del tejido sano que delimita con el tumor. (120,121,122)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Algunas de las principales ventajas de la SBRT se evidenciaron en el ensayo SPACE, donde se compararon los resultados obtenidos tras administrar dosis de 70 Gy en 35 fracciones mediante 3D-CRT frente a la administración de 66 Gy en 3 fraccionesmediante SBRT evidenciando una disminución del 22% y del 15% en la aparición de esofagitis y neumonitis asociadas al tratamiento, por lo que el empleo de esta técnica reduce la toxicidad del tratamiento y mejora la calidad de vida. Por su parte, el ensayo CHISEL fue el primero en evidenciar un aumento en la esperanza de vida a los 2 años que pasó de un 59% a un 77% (p=0,027). Otros ensayos se sumaron a estos, estableciéndose la dosis terapéutica que presenta un mayor beneficio con una menor aparición de eventos adversos en 50 Gy en 5 fracciones consecutivas, no debiéndose superar la dosis de 100 Gy a partir de la cual la frecuencia de aparición de eventos adversos grado 3 se dispara. (119)

Estos datos, sirvieron de precedente para plantear la posible sustitución de la cirugía en pacientes con adenocarcinoma de pulmón en fases tempranas por el tratamiento con SBRT radical. Ensayos como el RTOG 0618 concluyeron a este respecto que lospacientes operables con tumores en estadios I-II presentaron una tasa de control del tumor a los cuatro años del 96%, una baja morbilidad asociada al tratamiento y una infrecuente necesidad de un rescate quirúrgico por recaída. No obstante, no se pudo demostrar un mayor porcentaje de supervivencia a largo plazo (5 años) frente a la cirugía radical no habiendo podido sustituirla por tanto como tratamiento de práctica clínica habitual. Por el contrario, la SBRT si se ha convertido en el tratamiento estándar en pacientes con tumores en fases tempranas que presentan una edad avanzada yespecialmente en aquellos de edad muy avanzada (más de 80 años). (122,123,124,125,126)

Los ensayos aleatorizados ROSEL y STARS compararon el tratamiento quirúrgico con la SBRT en pacientes mayores de 70 años, no encontrando diferencias en el control oncológico, mientras la tasa de supervivencia a los 3 años fue superior para el tratamiento con SBRT (95%) que para el tratamiento quirúrgico (79%) y los efectos secundarios clásicos tales como neumonitis, dolor torácico o disfagia entre otros se presentaron exclusivamente en grado 1 atendido a los criterios CTCAE, aunque aún son necesarios estudios con mayor número de pacientes. (125)

La SBRT ha revolucionado el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón en estadios tempranos convirtiéndose en la terapia de elección en pacientes inoperables y en una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

alternativa razonable en pacientes operables. Así mismo ha posibilitado una nueva opción terapéutica a pacientes ancianos compatibilizando el tratamiento con sus posibles comorbilidades basales al reducir las visitas a los centros hospitalarios, así como las toxicidades. Entre sus principales inconvenientes, se encuentra la falta de criterios comunes en cuanto a la dosis y frecuencia del tratamiento, limitaciones en el conocimiento de la aplicabilidad en tumores superiores a 5cm y la tasa de recurrencia superior a la quirúrgica, siendo necesaria más investigación para validar marcadores que permitan seleccionar con precisión a aquellos pacientes que puedan obtener un mayor beneficio de la SBRT frente a la cirugía.

En lo que respecta a la administración de SBRT postcirugía actualmente la evidencia es escasa para establecer patrones de tratamiento, y dados los resultados negativos del metaanálisis PORT llevado a cabo por el *Meta-analysis Trialists Group* sobre el uso adyuvante de la radioterapia externa en pacientes con tumores en estadios I-II, no se recomienda el uso de SBRT en este contexto. (127,128).

Otro escenario muy distinto es el que podemos encontrar cuando hablamos del tratamiento con radioterapia en estadios avanzados de la enfermedad (III-IV). En estos casos, la radioterapia ya no es un método curativo *per se* en monoterapia, sino que debe ser combinado con agentes terapéuticos sistémicos para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

Loa adenocarcinomas de pulmón diagnosticados *de novo* en estadio III son irresecables hasta en un 50% de los casos. Entre los que son resecables, aproximadamente un 70% sufrieron recaída tras haber recibido cirugía como tratamiento único y un 40% lohicieron tras haber recibido tratamiento combinado con quimioterapia neoadyuvante y cirugía. Por este motivo, la cirugía ya no se aplicará como tratamiento único sino combinada con la quimiorradioterapia que pasará a ser el estándar terapéutico. (127)

Para comprobar la eficacia de la radioterapia como tratamiento neoadyuvante previo a la resección quirúrgica, se llevó a cabo un estudio multicéntrico a nivel europeo para comparar el beneficio de la quimiorradiación frente a la quimioterapia única en neoadyuvancia. Los resultados obtenidos no demostraron diferencias significativas en supervivencia, pero si en la disminución de ganglios mediatínicos presentando el mismo porcentaje de eventos adversos por lo que han de desarrollarse nuevos ensayos siguiendo esta hipótesis, aunque por el momento el tratamiento estándar en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

neoadyuvancia para estadios III sigue siendo la quimioterapia acompañada o no de inmunoterapia. (119,127)

En los casos no resecables (N2 multiestación), la secuencia, duración y combinación con agentes quimioterápicos aún es objeto de controversia. El estudio pivotal RTOG 9410 demostró un aumento de 14 meses a 17 meses (p=0.046) en supervivencia global en pacientes que recibieron radioterapia concomitante con la quimioterapia en lugar de aquellos que lo recibieron de modo secuencial. En un metaanálisis que incluyó siete ensayos se observó una mejoría de la supervivencia global a los 5 años del 4,5% y una reducción de hasta un 6% en la aparición de recurrencia local a los 5 años respecto a los pacientes que habían recibido quimioterapia y radioterapia de forma secuencial. (127)

Así mismo un metaanálisis ha demostrado que la quimioterapia basada en platino junto con la radioterapia torácica temprana (definida como el comienzo dentro de los 30 días desde el inicio de la quimioterapia) se asoció con una reducción significativa de la mortalidad a los 2 años (tasa de riesgo [HR]): 0,73, IC del 95 %: 0,57–0,94, P= 0,01) y 5 años (HR: 0,65, IC 95%: 0,45–0,93, P= 0,02). En cuanto a la periodicidad en el fraccionamiento de las dosis de radioterapia, el ensayo RTOG8311 demostrósuperioridad en cuanto a la supervivencia global en el brazo de tratamiento con hipofracción acelerada en dos administraciones diarias, en comparación con una administración diaria. No obstante, también se asoció a mayor frecuencia de apariciónde eventos adversos tales como la toxicidad cardiaca y especialmente la esofagitis grado3 (27% frente al 11%). (119,127, 129)

La quimiorradiación es compleja y todavía se sigue investigando qué agentes quimioterapéuticos son los mejores para lograr el mejor control de la enfermedad. Los regímenes concomitantes con radioterapia más utilizados son cisplatino/etopósido *vs* carboplatino/paclitaxel habiendo demostrado mayor eficacia en términos de supervivencia global la terapia basada en cisplatino. Dicha terapia presenta un gran número de toxicidades como esofagitis, mucositis, fallo renal agudo y especialmente neutropenias grado 3 y 4. Para sobreponerse a ello, algunos ensayos clínicos se están llevando a cabo con el fin de comprobar si es posible sustituir o combinar el régimen doblete platino por algún fármaco dirigido o por inmunoterapia. (127)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A este respecto, el estudio preliminar en fase I y II desarrollado por el *M.D. Anderson Cancer Center* concluyó demostrando la seguridad de la inmunorradioterapia

especialmente en pacientes con baja expresión de PD-L1, aunque la tendencia en investigación es complementar los esquemas de quimiorradioterapia basados en platinos con los fármacos dirigidos o inmunoterapia. Esta tendencia se analizará en mayor profundidad en el siguiente apartado de este trabajo. (130, 131)

Por su parte, la radioterapia jugará un papel principalmente paliativo cuando la enfermedad se presente en estadio IV, aunque también podrá ser ablativa en algunas oligometástasis (hasta 5 metástasis en un máximo de 3 órganos distintos).

La radioterapia ablativa se emplea de forma eficaz en las metástasis cerebrales, mejorando la calidad de vida del paciente. Según la revisión llevada a cabo por Vinod et al. (2020), la eficacia de esta técnica en otras localizaciones solamente se ha testado en dos pequeños ensayos randomizados llevados a cabo por Gómez et al. y Iyengar et al. en pacientes tratados en primera línea con terapia basada en platinos que no hubiesen progresado a la misma en el momento de recibir la terapia ablativa. Ambos estudios, arrojaron resultados prometedores en cuanto al tiempo de progresión libre de enfermedad y a las muertes relacionadas con el tratamiento, aunque si se vio aumentado el porcentaje de toxicidades. (119)

A pesar de los prometedores estudios comentados, la mayor parte de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado presentan metástasis diseminadas en varios órganos En estos casos, la radioterapia tiene una intención paliativa con el fin de aliviar síntomas y mejorar la calidad de vida del paciente.

No obstante, recientemente, en mayor medida en el caso de los adenocarcinomas, se han visto mejores resultados en cuanto a supervivencia y respuesta al tratamiento cuando se emplean fármacos dirigidos o de inmunoterapia en combinación con radioterapia o secuencialmente generándose una nueva posibilidad de tratamiento en fase IV. Algunos ejemplos de ensayos que actualmente están comprobando esta tendencia son: "*TKI followed by Thoracic Radiotherapy for stage IV EGFR Mutant NSCLC*" (NCT03916913), "*Concurrent EGFR-TKIs and Thoracic Radiation Therapy in Active EGFR Mutation for 1st Line Treatment of Stage IV NSCLC*" (NCT02353741), entre otros. (132, 133,134)

Finalmente, la braquiterapia para el adenocarcinoma de pulmón se utilizará principalmente de forma endobronquial en tumores localizados en las vías grandes implantando semillas de iodo 125. En fases tempranas de la enfermedad se emplea

USC DE COMPOSTELA

cuando el paciente no tolera ni la cirugía ni la SBRT. En fases más avanzadas se puede administrar sola o como refuerzo a la radioterapia externa, así como tratamiento de rescate en pacientes que han sufrido recurrencia tras haber recibido otros tratamientos(p. ej., cirugía, quimioterapia y EBRT), sin embargo, los estudios prospectivos a este respecto son escasos y por tanto son necesarios nuevos ensayos para poder vislumbrar elverdadero potencial de esta técnica que actualmente no se contempla como tratamiento de elección. (134)

3.1.4. Tratamiento sistémico: quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida

Tal y como se ha venido desarrollando en este texto, pese a los resultados obtenidos en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón mediante cirugía y radioterapia, en numerosas ocasiones, especialmente cuando hablamos de enfermedad avanzada la terapia farmacológica sistémica se vuelve indispensable.

Los pacientes cuya enfermedad es resecable y se encuentra en estadio IB-IIIA presentan una tasa de recaída a los 5 años de aproximadamente un 50% y un porcentaje de supervivencia de aproximadamente el 30%. Con el fin de mejorar estos porcentajes, la comunidad científica comenzó a desarrollar ensayos para testar el posible beneficio de ciertos fármacos administrados en fase neoadyuvante. Actualmente, existen pocos criterios para seleccionar los fármacos idóneos para su uso en neoadyuvancia, siendo en general empleados aquellos que han presentado eficacia y toxicidades manejables en pacientes con enfermedad en estadio IV. (136)

En un metaanálisis que incluyó varios estudios aleatorizados el uso de quimioterapia adyuvante se asoció con un aumento de la supervivencia del 5% a los 5 años en pacientes con estadios IB (> 4 cm), II y III. Respecto al número de ciclos, en ausencia de toxicidades limitantes se acostumbra a administrar 4 ciclos de quimioterapia. (136)

En el entorno neoadyuvante, aunque la terapia basada en platino sigue siendo la más estudiada, el tratamiento combinado con quimioterapia e inmunoterapia ha evidenciado mayores tasas de supervivencia libre de progresión, así como de respuesta patológica completa. (137,138,139)

La combinación entre estos inhibidores de punto de control inmunitario conquimioterapia basada en platinos en neoadyuvancia se estudió por primera vez en el ensayo TOP1201 no habiendo reportado aumentos en el registro de toxicidades

asociadas, retrasos en la cirugía o complicaciones en la misma debido a este tratamiento. (140)

Alguno de los ejemplos más recientes a este respecto, serían los ensayos clínicos CheckMate 816 (NCT02998528), NADIM (NCT03081689) o el LCMC3 (NCT02927301). Los dos primeros, evidencian la superioridad de la combinación de quimioterapia con nivolumab (CheckMate 816 pCR 24% *vs* 2.2%, PFS (3a) 31.6 *vs* 20.8 meses; NADIM pCR 85%, PFS (2a) 77%), mientras que el último lo hace con atezolizumab en monoterapia (pCR 20%, PFS (3a) 80%). Al igual que en el ensayo TROP1201, ninguno de estos ensayos registró un aumento de toxicidad y/o mortalidad asociada a inmunoterapia. (141,142,143)

Actualmente, la duda de combinar quimioterapia con estos inhibidores de punto de control inmunitario o administrarlos de forma secuencial o en monoterapia o combinado dos inhibidores de punto de control inmunitario entre ellos permanecen en el aire, encontrándose en desarrollo numerosos ensayos tales como IMPower03, Checkmate 816 o KEYNOTE 671 entre otros. No obstante, guías internacionales como *"The National Comprehensive Cancer Network"* (NCCN) ya recomiendan el empleo deinmunoterapia neoadyuvante, en adenocarcinoma de pulmón estadio II-III. (144, 145,146)

Tabla 4. Ensayos clínicos en curso con inhibidores de punto de control inmunitario en neoadyuvancia con o sin quimioterapia

Ensayo	NCT	Fase	Estadio	Tratamiento
MK3475-223	NCT02938624	I	I-II	Pembrolizumab a diferentes dosis/regímenes → Qx
TROP 1501	NCT02818920	II	IB-IIIA	Pembrolizumab (200 mg) x 2 ciclos→ Qx → Pembrolizumab (200 mg) x4 ciclos
SAKK 16/14	NCT02572843	II	IIIA	QT x 3 ciclos→ Durvalumab (750 mg) x 2 ciclos→ Qx → Durvalumab (750 mg) x 1 año
KeyNote 617	NCT03425643	III	II-IIIB	QT+pembrolizumab (200 mg) /placebo x 4 ciclos → Qx → Pembrolizumab/placebo x13 ciclos
CheckMate 816	NCT02998528	III	IB-IIIA	QT+ Nivolumab (360 mg) x3 ciclos → Qx *vs* QT x 3 ciclos → Qx
IMpower 030	NCT03456063	III	II-IIIB	QT+ atezolizumab (1200 mg) / placebo x 4 ciclos → Qx → atezolizumab/placebo x16 ciclos
AEGEAN	NCT03800134	III	IIA-IIIB	QT+ durvalumab (1500 mg) / placebo x 3 ciclos → Qx → durvalumab/placebo x 12 ciclos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La necesidad de combinar estos fármacos de punto de control inmunitario se ha puesto de manifiesto en mayor medida en estadio IIIA o IIIB resecable donde la probabilidad de que el paciente presente enfermedad residual o micrometástasis ganglionar no detectada y por tanto no resecada en la cirugía es mayor, pudiendo por tanto convertir tumores *borderline* no resecables en aptos para cirugía.

Biológicamente hablando, guarda mayor sentido emplear estos fármacos inmunoterápicos anti PDL-1 en pacientes cuyos tumores son grandes y presentan una gran carga antigénica. La muerte de las células tumorales mediada por inhibición de PD-L1 requiere de la presentación antigénica de las células tumorales que serán reconocidas por las células T del paciente. Tras la activación de las células T estas liberarán citoquinas tras el bloqueo de la interacción inmunosupresora de PD-1/PDL-1 capaces de generar la muerte de la célula tumoral, por lo tanto, a mayor carga antigénica tumoral mayor respuesta de células T antitumorales se presentará. Por este motivo, en esta fase concreta de la enfermedad la inmunoterapia neoadyuvante supera a la inmunoterapia adyuvante. (144)

Siguiendo esta estrategia terapéutica, ensayos realizados en ratones estudiaron la eficacia de la combinación de los fármacos inmunoterápicos anti-PD-1, anti-CTLA-4 frente a los mismos fármacos en monoterapia, advirtiendo que la combinación de estos fármacos reporta mejores tasas de supervivencia, así como de control de aparición de metástasis en neoadyuvancia que en adyuvancia. Estos resultados están actualmente testándose a través de numerosos ensayos clínicos como el NEOSTAR o el NEOMUN para pembrolizumab. (144,147)

Por otra parte, en los últimos años también se han comenzado a desarrollar ensayos clínicos para evaluar la eficacia de terapia dirigidas a oncogenes en el tratamiento adyuvante del adenocarcinoma de pulmón estadio III. Las terapias moleculares dirigidas producen tasas de respuesta al tratamiento en más de un 50% de los pacientes, reduciendo enormemente las toxicidades en comparación con las quimioterapias citotóxicas. (136)

El ensayo aleatorizado SWOG llevado a cabo en norte américa demostró que el inhibidor de EGFR gefitinib en monoterapia presenta mejor tolerancia y supervivencia libre de enfermedad en pacientes con mutación positiva de *EGFR* en comparación con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los pacientes tratados en adyuvancia con quimioterapia basada en cisplatino que presentan esta misma mutación. (148,149)

Este hallazgo, dio lugar a estudios sucesivos que buscaron comparar la eficacia de los distintos EGFR-TKIs disponibles en comparación con placebo. A este respecto, elensayo ADAURA demostró una acusada superioridad en términos de supervivencialibre de progresión a los dos años (89% *vs* 52%) al administrar osimertinib frente a placebo. Así mismo, este ensayo no reportó mayor tasa de aparición de eventos adversos graves de lo que ya lo habían hecho gerfitinib o erlotinib, convirtiéndose por tanto en el tratamiento adyuvante de elección en pacientes con tumores resecados en estadios IB-III con mutación positiva de EGFR.(148,149,150)

Otros fármacos dirigidos están siendo evaluados aún en fases tempranas como por ejemplo el selpercantinib mediante el ensayo clínico en fase II Libretto 432 para pacientes con fusión *RET* positiva, por lo que pronto habrá evidencia disponible sobre nuevos tratamientos en fase adyuvante. (136)

Por otra parte, estudios de casos evidenciaron la factibilidad de la administración de estos fármacos en neoadyuvancia, no habiéndose identificado nuevas toxicidades ni una mayor incidencia de complicaciones perioperatorias.

Del mismo modo, el ensayo IMpower010 demostró un beneficio en la supervivencia libre de enfermedad en pacientes tratados con atezolizumab adyuvante. Tras los notorios resultados positivos de los ensayos IMpower010 y ADAURA, la FDA en 2020 y posteriormente la EMA en 2021 aprobaron el uso de osimertinib adyuvante en pacientes cuyo estadio tumoral estuviese entre IB-III y presentasen mutación positiva de EGFR. Del mismo modo, en 2021 la FDA y posteriormente la EMA 2022 aprueban el uso de atezolizumab adyuvante en pacientes que presente un valor de PD-L1 superior al 50%. (151,152,153,154,155)

Para el adenocarcinoma de pulmón estadio III no resecable, el metaanálisis llevado a cabo por Auperin et al. (2010) puso de manifiesto la superioridad de la quimiorradioterapia frente a la quimioterapia y radioterapia consecutivas. La quimiorradioterapia ofrece un beneficio absoluto del 5.7% y del 4.5% en la supervivencia global a los 3 y a los 5 años respectivamente con respecto a terapia secuencial. No obstante, la quimiorradioterapia concomitante aumentó la toxicidad

USC DE COMPOSTELA

esofágica aguda (grado 3-4) del 4% al 18% (p<0,001) aunque no hubo diferencias significativas en cuanto a la toxicidad pulmonar aguda. (156,157)

Según la medicina basada en la evidencia de nivel I, el régimen de quimioterapia estará basado cuando se pueda en aproximadamente 4 ciclos de cisplatino pudiéndose combinar este con etopósido, vinorelbina u otros alcaloides de la vinca. Los regímenes de gemcitabina no están recomendados por la alta toxicidad pulmonar que acarrean. Por su parte, la dosis de radioterapia concomitante recomendada será de entre 60-66 Gy administrada en 30-33 fracciones. (156)

Una vez completada la fase de inducción, si se obtiene respuesta o estabilización de la enfermedad se valora el tratamiento de mantenimiento. Para este periodo, la EMA aprobó basándose en el estudio PACIFIC la administración de durvalumab durante un año en pacientes con tumores no resecables que presentasen expresión positiva de PD- L1 y cuya enfermedad no hubiese progresado tras el tratamiento con la quimiorradioterapia basada en platino. Este estudio, demostró que el tratamiento con durvalumb frente a placebo aumentó de 5.6 a 17.2 meses el tiempo libre de progresión, así como la supervivencia global a los 2 años del 55.6% al 66.3% (p=0,0025). Además, este fármaco presentó buena tolerancia, discontinuando por toxicidades asociadas al tratamiento solamente el 15.4% de los participantes. (156, 158,159,)

Pese a que el ensayo clínico PACIFIC marcó precedente logrando constituirse como tratamiento consolidativo estándar, Ráez et al. (2022) pusieron en evidencia la notoria desigualdad que se presenta en los índices de supervivencia global y entre población blanca y población hispánica (27 meses frente a 20), poniendo en tela de juicio la extrapolabilidad de estos resultados a todas las poblaciones. (160)

Actualmente, nuevas estrategias de tratamiento se están llevando a cabo para lograr mejoras en el tratamiento de los tumores no resecables en estadio III, destacando la combinación entre dos inhibidores de punto de control inmunitario como tratamiento de consolidación, la quimioinmunoradioterapia o la quimioinmunoterapia seguida de radioterapia en la fase de inducción o bien una combinación de estas estrategias.

El ensayo fase II COAST comparó la administración de durvalumab en monoterapia (brazo control) frente a la combinación de durvalumab con el anticuerpo monoclonal anti-CD73 oleclumab (brazo A) y frente a la combinación de durvalumab y el anticuerpo monoclonal anti-NKG2A monalizumab (brazo B) como consolidación tras la

USC DE COMPOSTELA

administración de quimiorradioterapia basada en platino. La tasa de respuesta objetiva fue muy superior en los brazos de terapia combinada en comparación con el brazo control, siendo un 17.9% para el brazo control, 30.0% para el brazo A y 35.5% para el brazo B, mientras que el porcentaje de eventos adversos no tuvo variaciones estadísticamente significativas. Los hallazgos del estudio COAST abren una nueva posibilidad de tratamiento que hoy se sigue evaluando a través del ensayo fase III PACIFIC-9. (161)

Otros ensayos como el PACIFIC-8 o el SKYSCRAPER-03 se encuentran testando la posible superioridad de los fármacos anti-TIGIT domvanalimab y tiragolumab, (este último en combinación con atezolizumab) frente a durvalumab en monoterapia en fase tras quimiorradioterapia, aunque los datos preliminares no han sido favorables. (161)

Por su parte, la combinación de durvalumab con ipilimumab que sí había demostrado eficacia en neoadyuvancia para los tumores resecables, no lo ha hecho así en el mantenimiento de los tumores no resecables. En esta ocasión, aunque la combinación de fármacos si volvió a demostrar un aumento en el tiempo libre de progresión y la supervivencia a los dos años, la diferencia no fue estadísticamente significativa, pero si lo fue la diferencia entre la aparición de eventos adversos (52.9% *vs* 38.9%) especialmente de neumonitis mayor o igual que grado 3 (17-6% *vs* 9.3%). (161)

Pese a que la combinación de estos fármacos no parece ofrecer beneficio debido a su elevada toxicidad frente a durvalumab en monoterapia, el ensayo CheckMate73L se encuentra actualmente evaluando el tiempo libre de supervivencia y la supervivencia global en pacientes tratados en fase consolidativa con nivolumab en combinación con ipilimumab o con durvalumab en monoterapia tras quimiorradiación en combinación con nivolumab frente a al protocolo PACIFIC (CCRT inducción + durvalumab en consolidación).(162)

Siguiendo la misma línea que el ensayo CheckMate73L, los ensayos NICOLAS, KEYNOTE-799, KEYLINK-012 o KEYVIVE-006 están evaluando la administración conjunta de quimiorradioterapia e inmunoterapia en fase de inducción seguida de una fase de consolidación y/o mantenimiento con la misma inmunoterapia empleada en la inducción. Los resultados obtenidos de estos estudios ayudarán a dilucidar si un tratamiento más intensivo mejora el resultado sin comprometer la seguridad. (161,163)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Respecto al adenocarcinoma de pulmón metastásico (estadio IV) la recomendación terapéutica se basa en la administración de quimioterapia basada en platino en primera línea en combinación con inmunoterapia, pudiéndose administrar en monoterapia si el paciente presenta contraindicación a inmunoterapia o un estado funcional deteriorado.

Si hablamos de la combinación de esta quimioterapia con algún fármaco dirigido o de inmunoterapia, el estudio ECOG 4599 demostró un aumento muy significativo en la supervivencia global en pacientes tratados con carboplatino/paclitaxel junto con el anti-VEGF bevacizumab en comparación con aquellos que fueron tratados con el doblete carboplatino/paclitaxel. Por su parte, el estudio AVAil también demostró eficacia en la combinación de bevacizumab con el doblete gemcitabina/cisplatino. Por la evidencia anteriormente expuesta, ESMO recomienda en aquellos pacientes que lo toleren el tratamiento en primera línea con cisplatino/pemetrexed/bevazizumab en pacientes con adenocarcinoma. En los casos en los que esta combinación no sea posible, la administración de pembrolizumab en monoterapia también será una opción para aquellos tumores que presenten un valor de PD-L1 superior al 50%. (164,165)

Tabla 5. Ensayos clínicos en curso con inhibidores de punto de control inmunitario con o sin quimioterapia en tumores de pulmón en estadio avanzado

Ensayo	NCT	Fase	Estadio	Tratamiento
NICOLAS	NCT02434081	II	IIIA/B	CCRT estándar + nivolumab (360 mg) x 4 ciclos → nivolumab (480 mg) x 1 año.
KEYNOTE 799	NCT03631784	II	III	Carboplatino AUC6 + paclitaxel (200 mg/m^2) + pembrolizumab (200 mg) x 1 ciclo → carboplatino AUC2 + paclitaxel (45 mg/m^2) x 6 semanas + pembrolizumab (200 mg) x 2 ciclos + RT estándar x 6 semanas → pembrolizumab (200mg) x 14 ciclos *vs* Cisplatino (75 mg/m^2) + pemetrexed (500 mg/m^2) + pembrolizumab (200 mg) x 3 ciclos + RT estándar x 6 semanas → pembrolizumab (200 mg) x 14 ciclos
KEYLINK 012	NCT04380636	III	III	Doblete platino estándar + pembrolizumab (200 mg) x 3 ciclos + RT estándar x 6 semanas → pembrolizumab + olaparib/placebo x1 año *vs* Doblete platino estándar + pembrolizumab (200 mg) x 3 ciclos + RT estándar x 6 semanas → pembrolizumab + olaparib (300 mg) x 1 año *vs* Doblete platino estándar x 3 ciclos + RT estándar x 6 semanas → durvalumab (10 mg/kg) x1 año
KEYVIVE 006	NCT02964013	I	IV	Múltiples dosis de vibostolimab y dosis/combinaciones de vibostolimab con pembrolizumab en diferentes poblaciones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Desde 2011 las guías de tratamiento de *"The National Comprehensive Cancer Network"* (NCCN) recomiendan la evaluación del estado mutacional de los pacientes enestadio IV. En caso de presentar alguna mutación para la que se disponga de un fármacodirigido, se recomendará la administración de este fármaco en cuestión en primera línea ya sea en monoterapia o combinado con quimioterapia. (166)

En el caso de los pacientes que presentan mutación de *EGFR*, los fármacos EGFR-TKIs erlotinib y gefitinib demostraron superioridad frente a la quimioterapia convirtiéndose en la recomendación del NCCN como terapia en primera línea. Actualmente, osimertinib es el fármaco de elección tras haber demostrado superioridad frente aerlotinib y gefitinib. No obstante, recientes estudios como el de Wen et al. (2018) entre otros, han evidenciado un mayor beneficio en el tiempo de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes tratados con los fármacos dirigidosEGFR-TKIs en combinación con la quimioterapia frente a aquellos tratados con quimioterapia o EGFR-TKIs en monoterapia. En el caso de este estudio, el tiempo libre de progresión aumentó de 12 a 20,5 meses, mientras la supervivencia global lo hizo de 18 a 36 meses. (146,167,168)

Para aquellos pacientes que presentan traslocación de *ALK* el metaanálisis desarrollado por Peng et al. (2021) puso de manifiesto un aumento de la supervivencia libre de progresión y una reducción del riesgo de aparición de metástasis en el sistema nervioso central estadísticamente significativo a favor de los ALK-TKIs alectinib, brigatinib, crizotinib, ceritinib, ensartinib, lorlatinib en comparación con la quimioterapia basada en platino. De ellos, alectinib es el que menos se relacionó con eventos adversos de grado 3, siendo lorlatinib quien más lo hizo: no obstante, lorlatinib fue el fármaco que mejor tasa de supervivencia libre de enfermedad arrojó. (168, 169,170)

La menor prevalencia de alteraciones en los genes *ROS1, RET, BRAF, HER2*, o *STK11* entre otros, reduce considerablemente el rango de fármacos disponibles que además en su mayoría se encuentran en fases preclínicas o clínicas tempranas, estando solamente disponibles a través de los ensayos clínicos. (164)

Para la traslocación de *ROS1*, los fármacos crizotinib y entrectinib han demostrado una tasa de respuesta objetiva de entre el 65-75% con un tiempo libre de progresión de hasta 20 meses y una supervivencia global de 50 meses. (171)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por su parte, el tratamiento con inhibidores selectivos de las TKI de *RET* como selpercatinib o pralsetinib ha demostrado superioridad frente a los inhibidores no selectivos de las TKI de *RET* cabozantinib o vandetanib, habiendo sido aprobadas para su uso en pacientes con tumores pulmonares de células no pequeñas por la FDA. En la actualidad, los ensayos en fase I/II LIBRETTO-001 y ARROW están comparando la administración de ambos fármacos en primera línea para establecer cuál es el más indicado. Por otro lado, el ensayo LIBRETTO-432 está comparando la eficacia de selpercatinib contra la quimioterapia estándar y la quimioinmunoterapia cisplatino/pemetrexed o cisplatino/pemetrexed/pembrolizumab. (171, 172)

En cuanto a *BRAF*, los fármacos dirigidos disponibles tienen como diana la mutación producida en V600E. Estos fármacos (vemurafenib y dabrafenib) han sido aprobados por las FDA y la EMA para el tratamiento de los tumores de pulmón, aunque actualmente aún no están aprobados en España. Los resultados de los ensayos preclínicos han demostrado eficacia de estos agentes en monoterapia y un ligero aumento de la apoptosis celular cuando se administran conjuntamente. No obstante, estos resultados son muy inmaduros y habrá que esperar los resultados de ensayos clínicos como el B-FAST (fase II/III). (171,173,174)

En cuanto a *KRAS*, cuando se descubrió que la mutación específica en *KRAS* G12C era un regulador alostérico capaz de provocar la inhibición del ciclo celular, un nuevo abanico de oportunidades terapéuticas surgió tras el fracaso de los inhibidores de la farnesilación de *KRAS*. Sotorasib se convirtió por tanto en el primer fármaco de esta clase aprobado por la FDA, aunque hoy en día hay numerosos ensayos en desarrollo evaluando la seguridad y eficacia de este fármaco. Un ejemplo de estos ensayos es el Codebreak 200 que evalúa la eficacia de sotorasib frente a docetaxel en pacientes con mutación *KRAS* G12C y enfermedad localmente avanzada no resecable que ya han sido previamente tratados. (175)

Sobre la fusión de *TNRK* el fármaco Larotrectinib que es un inhibidor altamente selectivo de la quinasa del receptor de la tropomiosina que a su vez es activo en el sistema nervioso central, ha demostrado eficacia en todo tipo de tumores que presentan esta alteración genética. La tasa de respuesta obtenida fue del 73%, el tiempo libre de progresión fue de aproximadamente 35 meses mientras que la supervivencia global fue de 40.7 meses, datos que parecen prometedores. El otro fármaco disponible entrectinib

USC UNIVERSIDADE

solo ha dado resultados positivos en pacientes que también presentan reordenamiento de *ROS1* siendo necesarios más ensayos. (176,177)

A pesar del elevado número de ensayos clínicos que se encuentran hoy evaluando la seguridad y eficacia de estos fármacos y sus distintas combinaciones, ya sea entre ellos o con otros grupos farmacológicos, son numerosas las dianas terapéuticas para las que aún no se dispone de fármacos accionables. Este hecho, supone una gran limitación terapéutica para aquellos pacientes portadores de estas mutaciones huérfanas de medicamento reduciendo significativamente su esperanza y calidad de vida. Así mismo esto representa una limitación para aquellos pacientes cuya enfermedad ha avanzado y quedan sin opciones terapéuticas.

Cuando tras la administración de un tratamiento en primera línea metastásica estefracasa y la enfermedad progresa el espectro terapéutico dependerá principalmente del estado del paciente (PS), de los fármacos disponibles y la decisión de un comité de tumores multidisciplinar.

Para aquellos pacientes que no presentan mutaciones que tengan una diana farmacológica accionable y tengan un PS 0-1, el tratamiento en segunda línea con docetaxel o pemetrexed ha demostrado aumentar la supervivencia global en hasta 9 semanas en comparación cuidados de soporte o vinorelbina/Ifosfamida en el caso de docetaxel y en comparación con docetaxel en el caso de pemetrexed, presentando el segundo menos toxicidades. El aumento en el número de líneas de tratamiento es directamente proporcional al descenso de la supervivencia global y de la tasa de respuesta del paciente. Tras la progresión a dos líneas de tratamiento y si el paciente se encuentra en condición óptima la opción recomendada será un ensayo clínico; cuando esto no sea posible, se valorará una nueva línea de quimioterapia (164,178)

Para los pacientes con reordenamiento de *ALK* el tratamiento en segunda línea será un inhibidor de tercera generación como por ejemplo lorlatinib. Tras haber progresado a dos líneas de tratamiento o ante toxicidad inaceptable se valorará iniciar tratamiento con otro inhibidor de *ALK* o bien con quimioterapia convencional, aunque actualmente no hay evidencia científica suficiente para sustentar la indicación de ningún tratamiento en concreto. (164,179)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, para el resto de las mutaciones que tienen un fármaco disponible aún no hay ninguna recomendación establecida para su uso en segunda o tercera línea metastásica.

3.1.5. Evaluación de la respuesta tumoral. Criterios de seguimiento de la progresión y resistencia farmacológica a través de técnicas multiómicas

Pese al exponencial desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón, desafortunadamente aproximadamente un 50% de los pacientes sufrirán una recaída y/o progresión de la enfermedad teniendo tasas de mortalidad a los 5 años del diagnóstico de hasta el 80%, siendo por ello crucial realizar una correcta evaluación de la respuesta tumoral, así como de los posibles agentes limitantes de la eficacia del tratamiento. (180)

La evaluación de la respuesta tumoral se llevará a cabo en la mayoría de los casos mediante los criterios RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumours) actualmente en su versión 1.1. Dichos criterios, buscan la unificación y estandarización de los criterios empleados para la medición del cambio del tamaño tumoral y/o la respuesta tumoral, estando ampliamente establecidos en los tumores NSCLC. En aquellos pacientes que hayan recibido tratamiento con inmunoterapia se recomienda el empleo de los criterios iRECIST ya que esta herramienta ha ayudado a identificar aparentes crecimientos tumorales como inflamaciones circundantes al tumor propias de la respuesta inmune evitando por tanto falsos diagnósticos de progresión de la enfermedad. Estos criterios se aplicarán sobre imágenes del tumor obtenidas principalmente mediante PET-CT con contraste 18F-FDG y/o CT-CAP. (166) La periodicidad en la realización de estos exámenes vendrá marcada por el tipo de tratamiento empleado, la fase de la enfermedad y/o la fase de recuperación.

El seguimiento de la progresión del tumor también se puede llevar a cabo o apoyar en otras técnicas como, por ejemplo, el seguimiento de biomarcadores en sangre.

En lo que respecta a los marcadores sanguíneos, valores elevados de CEA, CYFRA 21–1, y/o un índice elevado del ki67 podría ser indicativo de un crecimiento positivo tumoral. No obstante, estos marcadores son poco específicos, pues arrojan valores por encima del límite normal en presencia de enfermedad benigna (> 5 µg/l en el caso del CEA y > 2% para ki67). (181)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para sobreponerse al escollo que supone la baja especificidad de estos marcadores, el análisis de la cantidad de DNA libre circulante (cfDNA) y del DNA tumoral circulante (ctDNA) se han convertido en análisis de referencia tanto para el diagnóstico precoz de la enfermedad, así como de la progresión tumoral. La concentración de cfDNA en sangre, aunque variable entre individuos, se presenta en valores muy bajos, normalmente inferiores a los 10ng/mL. Su presencia elevada en sangre se correlaciona con trauma en el tejido, procesos inflamatorios o procesos neoplásicos. En el caso de los procesos neoplásicos, una parte sustancial del este cfDNA se corresponderá con el ctDNA, producto de los procesos de necrosis y/o apoptosis de las células tumorales. Recientemente, otros estudios han demostrado que este ctDNA también puede verterse al torrente sanguíneo contenido en células tumorales circulantes (CTCs) y/o exosomas producto de la actividad secretora de las células tumorales. (182, 183)

Siguiendo esta línea argumental se evidenció la correlación entre una mayor presencia de ctDNA en sangre y un mayor volumen tumoral con mayor vascularización. También,la detección en sangre de este biomarcador supuso un gran avance en pacientes cuyos tumores no podrían biopsiarse, permitiendo inferir la presencia de enfermedad maligna, así como la presencia de mutaciones genéticas de interés. La principal limitación para su implementación rutinaria en la práctica clínica es la necesidad de instrumentos de detección altamente sensibles no coste-efectivos en la actualidad. (183,184)

Así mismo, el empleo de técnicas multiómicas no solamente nos permitirá saber la cantidad de ctDNA presente, sino las características de este. El análisis de las metilaciones del DNA presentes en el ctDNA permite evaluar la respuesta al tratamiento, así como el pronóstico. Por ejemplo, la presencia de niveles elevados de APC y metilación del promotor RASSF1A en ctDNA dentro de las 24 h posteriores a la terapia basada en cisplatino es indicativo de muerte celular inducida por quimioterapia olo que es lo mismo, evidencia de respuesta al tratamiento. Por otra parte, la metilación de SHOX2, RASSF1A y RARB2 ha mostrado potencial para monitorizar la recurrencia de la enfermedad después de la cirugía y la quimioterapia. (183,185)

En términos de supervivencia, la presencia de metilación en *SOX17* para los adenocarcinomas operables ha demostrado tener un impacto negativo en la supervivencia, mientras que la metilación del promotor SFN (14–3-3 Sigma) se correlacionó con un riesgo reducido de muerte. Finalmente, la metilación de *DCLK1* fueasociada a una menor supervivencia en términos generales. (183)

El análisis de miRNA en suero sanguíneo también ha permitido monitorizar la evolución tumoral, siendo en este caso la sobreexpresión de miR-21 y miR-155 el indicativo de recurrencia tumoral. Por el contrario, ensayos en animales han demostrado regresión tumoral por apoptosis celular inducida por miR-34a. (183,164)

Si hablamos de resistencia farmacológica, el empleo de técnicas multiómicas ha permitido desentrañar alguno de los mecanismos causantes de la pérdida de efectividad terapéutica de los fármacos, favoreciendo en consecuencia una estimación más precisa del pronóstico a largo plazo.

En lo que respecta a la quimioterapia basada en platinos (fármacos más empleados en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón), los fármacos del grupo alquilante a base de platino encontrarán uno de sus principales mecanismos de resistencia en la activación positiva de la vía de reparación del DNA en respuesta al daño ejercido sobre su estructura por estos fármacos tratando de evitar la apoptosis celular. Cuando la capacidad de reparación del DNA es superior a la capacidad de dañar el DNA de los fármacos entonces estaremos ante un caso de resistencia farmacológica. Además, se ha evidenciado que la sobreexpresión de genes relacionados con la reparación por escisión de nucleótidos (NER) como por ejemplo *ERCC1* (grupo 1 de complemento cruzado de reparación por escisión) están directamente relacionados con esta resistencia a platinos por sobreexpresión de la vía de reparación del DNA. (186,187)

Otro gran grupo de citostáticos empleados en el adenocarcinoma de pulmón son los antimicrotúbulos. Estos, hallan su principal mecanismo de resistencia cuando se producen cambios en los microtúbulos mediados por un aumento en la dinámica de producción, la expresión de isotipos de tubulina alterados o la acetilación de la tubulina.Estos cambios en los microtúbulos pueden alterar la interacción entre el fármaco y el microtúbulo generando así resistencia. Los principales fármacos afectados por estaresistencia son el paclitaxel y el docetaxel. (186,187)

Otras vías de resistencia a los fármacos alquilantes basados en platino y antimicrotúbulos son: la disminución de la concentración intracelular de fármacos de platino por inhibición de la absorción del fármaco y mejora del flujo de salida ydesintoxicación del fármaco, la interrupción de la detención del ciclo celular y apoptosis, la activación de la transducción de señales relacionadas con la célula como son la proliferación y la supervivencia, la modulación epigenética, la transición epitelio-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

mesenquimal entre otras, cambios en la expresión de los microRNAs o las alteraciones metabólicas entre otros. (186)

Por su parte, el antineoplásico antifolato multidiana empleado en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón llamado Pemetrexed, presenta un patrón de resistencia altamente complejo. Varios estudios, han detectado una regulación a la baja del miembro 1 de la familia de transportadores de solutos del transportador de folato 19 (SLC19A1) y una regulación al alza de la uracil-DNA glicosilasa (UNG), una proteína asociada a la reparación de la escisión de bases para eliminar el uracilo del DNA, así como de la expresión de TYMS y el transportador ABC ABCC11/MRP8. (186,188)

Finalmente, dentro de los fármacos citotóxicos encontramos la gemcitabina, una antimetabolito que inhibe la síntesis de DNA mediante la incorporación de metabolitos (formas di o tri fosfato) en el extremo final de la cadena de DNA. El mecanismo de resistencia de este fármaco es aún hoy confuso, habiéndose encontrado algunos marcadores candidatos a determinar la sensibilidad hacia es te fármaco, siendo estos: dCK, TRIM22, CDKN1A/p21, CYP3A5, epóxido hidrolasa microsomal 1 (EPHX1) y ABCC6 (MRP6). (186,189)

La inmunoterapia, es otro de los grandes grupos farmacológicos para el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón. La resistencia a estos fármacos puede ser primaria (cuando se adquiere sin que haya habido previamente ningún beneficio clínico) o adquirida (aparece tras haberse producido un beneficio clínico). También puede ser intrínseca (atañe a las características relacionadas con la expresión génica, señalización celular, reconocimiento inmunitario y respuesta al daño en el DNA) o extrínseca (atañe al microambiente o la circulación sistémica en el proceso de activación de las células T) a las células tumorales. (190)

En el caso del cáncer, la resistencia a la inmunoterapia se clasifica en tres subgrupos: desierto inmune (la presencia del tumor no provoca ninguna reacción inmune), inmunitario inflamado (el tumor inhibe la actividad inmunitaria a pesar de presentar una gran infiltración de células inmunitarias) y excluido (el tumor impide la infiltración de células inmunitarias a pesar de una inmunogenicidad adecuada). (191)

USC DE COMPOSTELA

En esta tesis, por su finalidad, nos centraremos en las resistencias intrínsecas, dentro de las cuales, las características genómicas del tumor tomarán un papel principal. El avance en las técnicas de secuenciación ha permitido encontrar mutaciones no sinónimas

(generadoras de cambios funcionales y estructurales en las proteínas) que dan lugar a la expresión de neoantígenos en las células tumorales. Estos neoantígenos serán claves en la activación de las células T y consecuentemente en el desencadenamiento de larespuesta citotóxica contra el tumor. Una baja carga de mutaciones (TMB, calculada como el número de mutaciones no sinónimas por megabase de DNA) dará lugar a un bajo número de neoantígenos y finalmente a una reducida inmunogenicidad tumoral considerándose por tanto un indicador de resistencia. (190)

Siguiendo esta hipótesis, cabe esperar que una baja carga tumoral se correlacione con una peor respuesta a los fármacos anti-PD1/PDL1 en monoterapia y por tanto en una menor supervivencia. Un TMB elevado podría ser un indicador de mayor supervivencia siempre y cuando los neoantígenos no presenten una gran heterogeneidad entre ellos. (190)

La inestabilidad genética causada por alteraciones en la replicación y /o reparación del DNA dará lugar a un aumento del TMB y por consecuencia aumentará la inmunogenicidad. Es por ello, que aquellos tumores que presenten una alta inestabilidad de microsatélites se sugieren como predictores de sensibilidad a la inmunoterapia. (176)

Otro mecanismo de resistencia intrínseco génico a la inmunoterapia vendría dado ante el cambio generado en las citoquinas y células inmunes como resultado de la expresión aberrante de un oncogén o un gen supresor de tumores. Por ejemplo, aunque los tumores que albergan mutaciones de *EGFR* presentan una alta expresión del PD-L1, la activación de la cascada de EGFR da lugar a una resistencia tipo desierto inmune, a través del aumento de la modulación de supresores inmunitarios, incluidos los puntos decontrol inmunitario (PD-1, CTLA-4), las células inmunosupresoras (macrófagos y linfocitos T reguladores) y las citoquinas. Escenarios similares ocurren con el resto de las mutaciones génicas conocidas a excepción de *BRAF*, indistintamente de que la mutación se encuentre o no en la posición V600E y posiblemente también en *KRAS*. (192)

Por su parte, la cascada del interferón-gamma juega un papel determinante en la resistencia primaria, adaptativa y adquirida al tratamiento con inmunoterapia por su capacidad para regular al alza o a la baja la respuesta inmune. Cuando este se encuentra mutado pierde la capacidad de regular al alza la expresión de PD-L1 y de MHC-1 dando

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lugar a la pérdida de reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune. (190,193)

Otros mecanismos intrínsecos de resistencia a la inmunoterapia están relacionados con las firmas transcripcionales, las modificaciones epigenéticas, la estabilidad de los complejos reparadores de cromatina, las deficiencias en la presentación antigénica o la falta de expresión de PD-L1 en las células. Como la información sobre estos mecanismos es aún hoy limitada y su conocimiento no es el objetivo principal de este manuscrito no se mencionarán en profundidad en el mismo. (190)

En último lugar, encontraríamos la resistencia a los fármacos dirigidos: inhibidores de *EGFR, ALK, ROS1, BRAF, RET, MET, NTRK* y *KRAS*. Los mecanismos generadores de resistencia de estos fármacos son muy complejos y poco conocidos en la actualidad, aunque sí es sabido que aparecerán en aproximadamente un 60% de los casos. (180) Todos estos fármacos dirigidos, comparten su actividad farmacodinámica por lo que se infiere la posibilidad de que también compartan patrones de resistencia.

La resistencia primaria vendría dada por la propia adaptación de la célula tumoral ante la inhibición farmacológica de la mutación contra la que se dirige el medicamento. Cómo respuesta la célula tumoral genera nuevas mutaciones a través de las cuales puedas garantizar la supervivencia de la célula. (195)

Ante la aparición de estas nuevas mutaciones o resistencia adquirida y el tratamiento con un anti-TKI de segunda generación aparecerán mecanismos de resistencia dependientes o independientes del gen de interés. Un ejemplo de mecanismo de resistencia dependiente sería la amplificación del gen de *ALK* y la resistencia a crizotinib o la mutación G1202R en ALK como resistencia principal de los ALK-TKIs.
(181) Este mismo patrón de amplificación y/o mutación génica que cursa con la generación de resistencia farmacológica lo encontramos en *EGFR, RET, BRAF, ROS1* o *MET*.(181,182,183,184) Por su parte, los mecanismos de resistencia independientes se basan en la activación de vías de señalización alternativas (conocida la activación por mediación de la señalización de la vía de EGFR, amplificación de *MET* o presencia de la mutación *BRAF* V600E), en la sobreexpresión de proteínas reguladoras (como la glicoproteína p), en trasformaciones histológicas o en la activación de la transición epitelio-mesenquimal de la célula tumoral. (195)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pese al gran beneficio que supone el empleo de todas estas técnicas, la estandarización de los métodos de análisis supone un gran hándicap debido a su alta variabilidad de expresión entre grupos de individuos y/o poblaciones, esto sumando al complejo y en ocasiones mixto manejo terapéutico del adenocarcinoma de pulmón que da lugar a la aparición de numerosos mecanismos de resistencia farmacológica en ocasiones de forma simultánea convierten en una tarea sumamente compleja revelar las causas subyacentes que provocan la aparición de estas resistencias. Sin embargo, conocerlas es clave para el desarrollo de nuevos fármacos por lo que el empleo de técnicas multiómicas es y seguirá siendo clave en este propósito.

3.2. Tratamiento del adenocarcinoma colorrectal

Al igual que en el caso del adenocarcinoma de pulmón, el tratamiento deladenocarcinoma de colon es variado y dependerá del estadio tumoral, de la probabilidadde recaída, de las comorbilidades que presente el paciente, de la edad, de la evoluciónde la enfermedad, de la preferencia del paciente y/o de los recursos disponibles en el centro hospitalario entre otros, aunque en este caso, presenta un mayor grado de controversia y un menor nivel de estandarización.

En los adenocarcinomas colorrectales diagnosticados en estadio 0, el tratamiento de elección será la cirugía radical, habiéndolo establecido así en sus guías la Sociedad Japonesa de Cáncer de Colon. (185) Debido al pequeño tamaño de las lesiones, frecuentemente se recurre a la extirpación local a través del canal anal, bien mediante la técnica de polipectomía, escisión transanal o microcirugía endoscópica transanal. El empleo de estas técnicas reduce notablemente la aparición de comorbilidades asociadas al no generarse un estoma permanente. (199,200,201)

En este caso, aunque nos encontremos en una fase temprana de la enfermedad no hay estudios que avalen la eficacia de la terapia expectante frente a la cirugía radical, pudiéndose contemplar únicamente su aplicación en el contexto de un ensayo clínico, en aquellos pacientes que rechacen someterse a una intervención quirúrgica o en aquellos que presentan la neoplasia en la mitad inferior del recto (área cuya intervención compromete en mayor medida el funcionamiento normal de este órgano) siempre y cuando presenten un bajo índice de recurrencia. (202)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para los adenocarcinomas colorrectales en estadio I, el tratamiento estandarizado será igualmente la cirugía. (199,203) En estos casos, el tipo de cirugía dependerá de la

localización del tumor, aunque el estudio llevado a cabo por la "*Alliance for Clinical Trials in Oncology*" completado en 2004 reveló una misma tasa de supervivencia y recidiva a los tres años en aquellos pacientes sometidos a una cirugía laparoscópica que aquellos sometidos a una resección abierta.(204) Tras la cirugía, el oncólogo decidirá si es necesario completar el tratamiento con quimioterapia adyuvante o radioterapia pues para esta fase de la enfermedad no hay guías establecidas a este respecto.

El empleo de terapia neoadyuvante con quimioterapia, inmunoterapia y/o radioterapia aún no está estandarizado, aunque, por ejemplo, los resultados del ensayo clínico ACOSOG Z6041 (NCT00114231) apuntaron hacia una mayor conservación del órgano en pacientes con tumores T2N0 sometidos a cirugía tras recibir neoadyuvancia con capecitabina, oxaplatino y radioterapia.(205) Desafortunadamente, la supervivencia a los tres años fue inferior a la esperada, teniéndose que realizar más ensayos a este respecto para poder evaluar el verdadero potencial de la terapia neoadyuvante en fases tempranas.

La cirugía es el tratamiento estándar en los tumores en estadio II. La administración neoadyuvante de quimioterapia concomitante con radioterapia en los tumores rectales ha demostrado en ensayos clínico superioridad en términos de supervivencia global, supervivencia a largo plazo y supervivencia libre de enfermedad (199,200). En lo que respecta al tratamiento postquirúrgico, en este caso sí es recomendable administrar terapia adyuvante en los casos que presentan un mayor riesgo de recaída, no habiendo presentado por el contrario diferencias relevantes en términos de supervivencia y/o recurrencia su empleo en otro grupo de pacientes con enfermedad en estadio II. (199,200,203)

En el caso de los adenocarcinomas colorrectales diagnosticados en estadio III o localmente avanzados, el tratamiento más efectivo será la combinación de quimioterapia, radioterapia (solamente en adenocarcinoma rectal) y/o cirugía. Al igual que en el caso del adenocarcinoma de pulmón la valoración del tratamiento y secuencia de este más adecuada se someterá a un comité de expertos. No obstante, el tratamiento de preferencia será la cirugía seguida de quimioterapia adyuvante especialmente a través de los regímenes FOLFOX o CAPOX. Dependiendo de las características del paciente también se podrá administrar 5-FU con leucovorina o capecitabina en monoterapia. (199,206)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En aquellos estadios III donde la cirugía no represente una posibilidad terapéutica (especialmente estadios IIB y IIIC) el tratamiento será quimioterapia, inmunoterapia pudiéndose combinar con radioterapia en los casos donde el tumor se encuentre en el recto. Las posibles combinaciones terapéuticas se establecerán dependiendo del estado de salud del paciente.

En cuanto a los pacientes diagnosticados en estadio IV, la intención del tratamiento será paliativa al igual que en el caso del adenocarcinoma de pulmón. Así mismo, el tratamiento y su secuencia dependerá de la cantidad de órganos afectados, del nivel de afectación de estos y de la condición general de salud del paciente. Cuando las metástasis se encuentren en un solo órgano o en varios órganos, pero localizadas, se puede plantear cirugía, mientras que el tratamiento a nivel colorrectal se llevará acabo dependiendo de la etapa T y N en la que se encuentre el tumor; la quimioterapia sistémica será el tratamiento principal. También, la cirugía podrá realizarse sobre la zona colorrectal afectada si hay riesgo de obstrucción intestinal, mejorando la calidad devida del paciente. (207,208)

Durante esta fase de la enfermedad es altamente recomendable el estudio genético del tumor con el fin de poder ofrecer al paciente una terapia dirigida. Actualmente, son escasas las terapias dirigidas disponibles, a diferencia del adenocarcinoma de pulmón.

Entre las terapias dirigidas disponibles encontramos los fármacos bloqueadores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (bevacizumab, ramucirumab y Ziv-aflibercept), los medicamentos anti-EGFR (cetuximab y panitumumab) y un único inhibidor de quinasas llamado regorafenib. (206)

Como ya se ha mencionado la quimioterapia se convierte en el tratamiento principal pudiendo combinarse con los tratamientos dirigidos disponibles en aquellos pacientes candidatos, siendo los esquemas de tratamiento más empleados (206,207,208):

- FOLFOX: leucovorina, 5-FU, y oxaliplatino
- FOLFIRI: leucovorina, 5-FU, e irinotecán
- CAPEOS o CAPOX: capecitabina y oxaliplatino
- FOLFOXIRI: leucovorina, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán
- Cualquiera de las combinaciones anteriores más un medicamento anti-VEGF o anti-EGFR.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- 5-FU con leucovorina, trifluridina y tipiracil o capecitabina en monoterapia.
- Cetuximab, panitumumab o regorafenib en monoterapia.

En caso de progresión de la enfermedad o ante la aparición de toxicidad inaceptable se valorará otra línea de tratamiento. Otra opción disponible tras el fracaso de la quimioterapia sería el tratamiento con un medicamento de inmunoterapia como el pembrolizumab, siempre y cuando exista inestabilidad microsatélites alta (MSI-H) o deficiencia del sistema de reparación de apareamientos erróneos (dMMR). (207)

Actualmente, son escasos los fármacos dirigidos disponibles en comparación con las mutaciones genéticas descubiertas que pudieran ser candidatas a convertirse en una diana terapéutica. Esto sumado al comportamiento errático presentado habitualmentepor los tumores colorrectales pone de manifiesto la necesidad del empleo y desarrollo de las técnicas multiómicas, claves en la consecución de una medicina de precisión eficaz y disponible para todos los pacientes.

3.2.1. Vigilancia activa

Al igual que en los adenocarcinomas de pulmón, la vigilancia activa constituye un recurso terapéutico en aquellos casos donde su empleo no comprometa la esperanza de vida del paciente o bien el empleo de otro tratamiento sea nocivo para el mismo (edad avanzada, comorbilidades, etc..).

En estadios tempranos, el tratamiento con cirugía ha demostrado un control eficaz de la enfermedad tanto localizada como localmente avanzada, descartando el empleo de la vigilancia activa como recurso terapéutico de primera elección.(202) No obstante, el beneficio del empleo de esta técnica ha sido y está siendo testado en pacientes que presentan respuesta clínica completa (cCR) tras haberse sometido a tratamiento neoadyuvante con quimioterapia y/o radioterapia en términos de resultados oncológicos frente a aquellos pacientes que si se han sometido a una cirugía radical.

Para este propósito, los estudios llevados a cabo por Habr-Gama et al. (2004), fueron los primeros en demostrar que la vigilancia activa era segura y eficaz en pacientes que habían recibido tratamiento neoadyuvante y tras el habían alcanzado respuesta clínica completa, en comparación con aquellos que se había sometido a cirugía radical habiendo conseguido una respuesta patológica completa tras ella. Estos hallazgos fueronvalidados por los estudios desarrollados en Holanda por Maas et al. (2011) o en el

USC DE COMPOSTELA

Reino Unido por Renehan et al. (2016) En todos ellos se evidenció una mayor conservación del órgano afectado y un menor índice de comorbilidad asociada al tratamiento en los pacientes que no habían sido intervenidos quirúrgicamente. Asímismo, la tasa de supervivencia global como el intervalo libre de enfermedad nopresentaron diferencias estadísticamente significativas. (209,210,211)

Algunos de estos estudios mencionados, se llevaron a cabo con una muestra pequeña de pacientes y la supervivencia de estos fue evaluada por un periodo corto de tiempo. Para sobreponerse a esta limitación, centros como el neoyorquino *Memorial Sloan Kettering* puso en marcha en 2006 de forma pionera un estudio para evaluar la eficacia de la vigilancia activa a largo plazo en pacientes con tumores rectales tras haberse sometido a tratamiento neoadyuvante con CCRT y/o quimioterapia de inducción o consolidativa dependiendo del esquema de tratamiento elegido y que hubiesen alcanzado respuesta clínica completa al tratamiento. El grupo control se conformó con pacientes tratados con escisión mesorectal total que hubiesen alcanzaron respuesta patológica completa tras el tratamiento. Estos datos fueron obtenidos de las historias clínicas de forma retrospectiva. (212)

La vigilancia activa se llevó a cabo a través de la realización de una endoscopia cada tres meses durante el primer año, cada cuatro meses durante el segundo año y cada seis meses durante los siguientes tres años. Los datos obtenidos arrojaron resultados excelentes en términos de preservación de la integridad del órgano (82%), presentando al final del seguimiento un estoma permanente el 10% de los pacientes frente al 15% de los que se sometieron a la cirugía radical. El porcentaje de recaída se mantuvo constante entre un 20-30% a pesar de la variabilidad entre los tratamientos neoadyuvantes. Por el contrario, la supervivencia global, fue menor que en los pacientes sometidos a cirugía (94% *vs* 85%) y la incidencia de progresión a distancia fue mayor (8% *vs* 4%). (198) En el año 2021, el estudio de Wang et al. (2021) obtuvo las mismas conclusiones validando los datos obtenidos. (213)

Pese a que la estrategia de vigilancia activa es segura para la mayoría de los pacientes, determinar con mayor precisión los criterios para establecer el riesgo de recaída (hasta hoy a consideración del equipo clínico responsable del paciente) así como el tratamiento neoadyuvante más beneficioso (actualmente supeditado a los ensayos clínicos) permitirá una selección de pacientes beneficiarios de esta herramienta más adecuada.

USC UNIVERSIDADE

Ante escenarios clínicos donde la enfermedad se encuentra en fase avanzada o elpaciente no pueda ser sometido a terapia activa no hay guías ni ensayos clínicos que avalen el empleo de la vigilancia activa quedando su utilidad a criterio del equipo clínico responsable del paciente.

3.2.2. Cirugía

La cirugía es el tratamiento estandarizado para los adenocarcinomas colorrectales en estadios tempranos. Usualmente, su intención es radical en sí misma, aunque en los casos donde la enfermedad ha invadido otros órganos (metástasis) puede tener una intención paliativa. En ambos casos, puede ser antecedida o precedida por quimioterapia y/o radioterapia (el empleo de radioterapia es exclusivo para los tumores rectales).

El tipo de resección dependerá especialmente de la localización del tumor (concretamente de la distancia hasta el orificio anal), la extensión del tumor, las comorbilidades anestésico-quirúrgicas que presente el paciente, el objetivo de la cirugía, los recursos disponibles o de los hallazgos intraoperatorios que pueda observar el cirujano. En cualquier caso, es recomendable la realización de una resección en bloque del tumor acompañada del tejido circundante (márgenes) en la dimensión que el cirujano considere que garantiza la eliminación total del tumor, así como de los ganglioslinfáticos cercanos.

Las principales opciones quirúrgicas para la extirpación del adenocarcinoma colorrectal son (214,215,216,217,218):

- Polipectomía: indicada en aquellos tumores malignos o premalignos tan pequeños que estén contenidos en el pólipo. La resección se realizará mediante un asa de alambre que aplica una corriente eléctrica o frío a través del colonoscopio. Se emplea tanto en tumores de recto como de colon.
- Escisión local: el cáncer está contenido dentro del revestimiento del recto o del colon. Se extrae con diversos instrumentos a través del colonoscopio y en este caso si se extirpa el tejido sano circundante de la pared del recto.
- Resección transanal local: se emplea en tumores de pequeño tamaño, normalmente en estadio I y que se encuentren cerca del ano. En esta ocasión el cirujano atraviesa todas las capas del recto para extirpar el tumor y el tejido sano circundante. El abordaje es no invasivo a través del orificio anal.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Microcirugía endoscópica transanal: se emplea en tumores en estadio normalmente I que se encuentran más lejos del ano y no pueden alcanzarse mediante la resección transanal local. Se realiza a través del ano mediante un instrumento magnificador especial y requiere de cirujanos entrenados en la técnica.
- Resección anterior baja: empleada en tumores en estadio I, II y III que se localizan en la parte superior del recto. En esta ocasión la incisión es abdominaly se extrae el tumor, el tejido sano que rodea el tumor y los ganglios circundantes. Finalmente, el colon se conecta al recto restante no viéndose afectada la función intestinal. Cuando la afectación es mayor se realiza una ileostomía temporal hasta que el recto ha sanado.
- Proctectomía con anastomosis coloanal: empleada en los cánceres en etapa II y III que se encuentran en el tercio medio inferior del recto y que requieren la extirpación total del mismo, así como de los ganglios. En este caso el colon se unirá directamente al ano para procurar la conservación de la función secretora. Del mismo modo que en la resección anterior baja en algunas ocasiones se realizará una ileostomía de corto plazo hasta que el intestino se cure.
- Resección abdominoperineal: se emplea para tratar tumores de la parte inferior del recto que han invadido el músculo del esfínter anal o los músculos elevadores. En esta ocasión se extirpa el recto, el ano y los tejidos circundantes mediante incisión abdominal resultando en una colostomía permanente.
- Exenteración pélvica: se realiza en los casos donde el tumor ha invadido órganos adyacentes como la vejiga, la próstata o el útero. El cirujano extirpará todas las áreas afectadas y la cirugía resultará en una colostomía permanente.
- Colostomía de derivación: cuando el cáncer se propaga de tal forma que obstruye el recto o el colon, el cirujano realiza un corte en el colon por encimade la zona obstruida que conectará al exterior a través de un estoma permanente. En ocasiones la zona afectada por el tumor no es retirada.
- Resección segmentaria: el cirujano extrae la zona del colon que contiene el tumor, así como el tejido sano circundante y al menos doce ganglios. Seguidamente reconecta las secciones restantes del colon o cuando esto no es posible conecta al colon al exterior a través de un estoma.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Colectomía total: el cirujano extirpa el colon en su totalidad. Esta cirugía no se realiza de forma rutinaria por su alto impacto, sino que se reserva para aquellos casos donde el resto de la pared del colon que no contine el tumor también está afectada por ejemplo por un gran número de pólipos o por una inflamación crónica. El resultado de esta cirugía será una ileostomía permanente.

A excepción de la polipectomía, la escisión local o la resección transanal que serealizarán de forma mínimamente invasiva a través del colonoscopio, el resto de las modalidades quirúrgicas podrán realizarse por laparoscopia o bien por resección abierta.

Los principales efectos secundarios derivados de la cirugía colorrectal cursan con la pérdida de la contención fecal y urinaria, así como con la pérdida o empeoramiento de la función sexual. A ellos, habría que sumar las complicaciones inmediatas tras la cirugía como son las infecciones, las dehiscencias o los sangrados, así como las complicaciones derivadas de las comorbilidades previas que pudiese presentar el paciente. (215)

Estos efectos secundarios aparecen en mayor medida tras una resección abierta. Es por ello, que, en estadios tempranos, así como en pacientes con comorbilidades las técnicas endoscópicas serán las de elección. Dichas técnicas han demostrado una disminución en la aparición de comorbilidad asociada a la técnica, una disminución en el tiempo de ingreso hospitalario, así como una baja posibilidad de deterioro del tránsito intestinal, conduciendo a mejores resultados en términos de calidad de vida. (214,215)

Por el contrario, esta es la técnica que más posibilidad de perforación intestinal presenta, así como dificultad para extirpar los márgenes del tumor, no estando indicada en tumores que presenten alto riesgo de recaída (>T1). Algunas guías clínicas como la del "*Committee of the European Society of Coloproctology*" recomiendan estas técnicas, aunque sus detractores recomiendan ampliar los estudios en este campo antes de estandarizarlas. (215)

Para el resto de los tipos de resección mencionados, el abordaje puede ser bien laparoscópico o abierto. Estudios como los recogidos en la revisión realizada por Matsuda et al. (2018), muestran que las investigaciones de Kitano et al. o el metaanálisis llevado a cabo en el Reino Unido por Athanasiou et al. no han podido evidenciar diferencias en términos de mortalidad a corto plazo, supervivencia global o intervalo libre de enfermedad presentados por el abordaje laparoscópico frente a la

USC DE COMPOSTELA

cirugía abierta en la resección de tumores de colon. Así mismo, el abordaje laparoscópico si ha supuesto una menor aparición de morbilidad relacionada con la intervención, así como una reducción del tiempo de recuperación. (214)

Contrariamente, en el caso de los tumores rectales los últimos metaanálisis han puesto de manifiesto la posible inferioridad del abordaje laparoscópico frente a la cirugía abierta. Si bien en primera instancia los resultados de los ensayos entre ellos el ALaCaRT obtuvieron resultados patológicos y oncológicos similares entre ambas técnicas, ensayos más recientes como el ACOSOG Z6051demostró superioridad en estos mismos términos para la cirugía abierta, aunque la supervivencia libre de enfermedad a los tres años no presentó diferencias estadísticamente significativas. No obstante, debe ser evaluado a largo plazo el impacto de estos resultados patológicos inferiores sobre la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad antes de rechazar el abordaje laparoscópico. (214)

En pacientes con adenocarcinoma de recto estadios II y III el tratamiento neoadyuvante con radio y quimioterapia es la modalidad estándar. Como se ha descrito anteriormente, los pacientes con tumores en estadios tempranos serán sometidos a cirugía radical como primera elección, mientras que aquellos que alcancen respuesta completa tras recibir quimioterapia neoadyuvante se someterán a vigilancia activa en lugar de a cirugía radical. (214,215)

Por su parte, para aquellos tumores rectales localmente avanzados en los que sí se valore administrar terapia neoadyuvante, hasta la fecha, el tratamiento estándar es la quimioterapia basada en fluorouracilo junto con radioterapia. La administración de estos tratamientos no ha reportado diferencias significativas en el porcentaje de cirugías con resultado R0, aunque este tratamiento supone una alta toxicidad para el paciente. Los últimos ensayos, han evidenciado la efectividad del esquema FOLFOXIRI en la reducción del volumen del tamaño del tumor y por tanto una mayor tasa de cirugías con resultado R0, no obstante, son necesarios más ensayos clínicos antes de obtener conclusiones definitivas. (214)

Por otra parte, la cirugía se empleará como recurso terapéutico en aquellos pacientes que presenten una o varias metástasis localizadas independientemente de que pueda ser o no resecado el tumor primario ya que se ha demostrado que su extirpación ha

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

demostrado un aumento en la supervivencia global, así como en la supervivencia a largo plazo de los pacientes. (219,220)

3.2.3. Radioterapia

La radioterapia forma parte de los recursos disponibles para el tratamiento del adenocarcinoma colorrectal. Contrariamente al caso de los adenocarcinomas de pulmón, en esta ocasión no presentará un papel protagonista pues en raras ocasiones constituirá por sí misma un tratamiento radical.

En estadios tempranos (pT1-2), la radioterapia se empleará principalmente en neoadyuvancia en aquellos tumores que por su situación anatómica extraperitoneal(recto y recto-sigma) limiten la obtención de márgenes radiales óptimos (≤ 1 mm) y por tanto presenten un mayor riesgo de recidiva local. Así mismo aquellos tumores cT1-2 que cumplan criterios de alto riesgo (baja diferenciación celular, invasión lifovascular, presencia de gemación tumoral o invasión submucosa profunda) también serán candidatos para recibir radioterapia previa a la cirugía radical. (221)

La radioterapia será administrada de forma externa, hipofraccionada, en modalidad tridimensional conformada y será de ciclo corto; aproximadamente cinco sesiones de 5 Gy para una administración total de 25Gy. Como ya se ha mencionada esta terapia para tumores en fase temprana no está estandarizada por lo que la frecuencia y dosis pueden variar entre centros. (222)

En lo que respecta a la radioterapia post quirúrgica en estadios tempranos está únicamente indicada en aquellos tumores que tras haber sido intervenidos son re- estadiados patológicamente como estadios II o III. En términos generales, el empleo de esta técnica no ha demostrado superioridad en lo que se refiere a supervivencia global nisupervivencia libre de enfermedad en estadios tempranos frente a la cirugía radical en solitario por lo que su empleo deberá limitarse a casos concretos. (221)

Por el contrario, la radioterapia presenta mayor relevancia en el tratamiento de los adenocarcinomas rectales en estadios localmente avanzados (II-III). Cuando estos tumores son resecables, estudios como los de Abraha et al. (2018) y Suppiah et al. (2009) han comparado los beneficios y perjuicios de la administración de radioterapia en monoterapia previa a la cirugía radical frente al tratamiento único quirúrgico en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

adenocarcinomas rectales en términos de mortalidad global, recurrencia de laenfermedad, conservación del órgano y toxicidades asociadas. (222, 223)

Ambos metaanálisis evidenciaron que la radioterapia neoadyuvante reduce la recurrencia tumoral a los 5 y 10 años. Así mismo se puso de manifiesto un discreto beneficio en lo que respecta a la supervivencia y la mortalidad global. Por el contrario,la tasa de toxicidad asociada al tratamiento junto con la tasa de complicaciones asociadas a la cirugía fue mayor en los pacientes tratados con radioterapia neoadyuvante. Pese a ello, la administración de radioterapia neoadyuvante reportó mayores beneficios en los mismos parámetros mencionados anteriormente que al ser administrada en monoterapia en adyuvancia, quedando esta última reservada para aquellos pacientes cuyos márgenes quirúrgicos no estén libres de enfermedad tras la cirugía. (222, 223)

Pese a haber reportado beneficios, la radioterapia en monoterapia pre o post operatoria actualmente no tiene dosis ni frecuencias estandarizadas, esto es debido a que su administración conjunta con fármacos antineoplásicos ha reportado mayores beneficios que administrada en monoterapia.

Uno de los estudios más representativos realizados en Europa a este respecto fue el desarrollado por el grupo EORTC. En él se testó la eficacia de la combinación de quimioterapia al tratamiento radioterápico previo a la cirugía, observándose una tasa de respuesta completa al tratamiento muy superior en el brazo de pacientes tratados con quimiorradioterapia que en los tratados con radioterapia en monoterapia. (199)

Habiéndose demostrado la superioridad terapéutica de la quimiorradioterapia, el trabajo de los alemanes Sauer et al. (2004) evidenció que esta combinación de quimioterapia y radioterapia administrada en neoadyuvancia proporciona un mejor control local de la enfermedad, una mayor disminución del tumor y un menor índice de aparición de toxicidades en grado 3 o superior en comparación con su administración en adyuvancia. (224)

Los fármacos administrados junto con la radioterapia en estas investigaciones fueron el 5-FU, capecitabina y 5-FU en combinación con oxaliplatino. Los dos primeros tienen niveles similares de eficacia y seguridad, considerándose el tratamiento estándar para la concomitancia con radioterapia. Por el contrario, la combinación de fluoropirimidinas y oxaliplatino demostró a través de ensayos como el STAR-01 o el ACCORD 12/0405

USC DE COMPOSTELA

PRODIGE 2 un mayor índice de aparición de eventos adversos sin haber podido demostrar superioridad para alcanzar respuesta completa al tratamiento. (199, 225,226)

En los últimos años, el desarrollo exponencial de fármacos de inmunoterapia ha proporcionado una nueva herramienta terapéutica en el tratamiento del adenocarcinoma colorrectal. Estudios preclínicos han reflejado la capacidad de la radioterapia para promover la inmunidad antitumoral. Siguiendo este razonamiento, la comunidad científica se plantea si la sinergia entre quimiorradioterapia e inmunoterapia administrada en pacientes con enfermedad localmente avanzada da lugar a una mejor respuesta tumoral.

Actualmente, son numerosos los ensayos que se están desarrollando a este respecto con diferentes esquemas de tratamiento, aunque todos ellos se encuentran en fases tempranas. No obstante, los primeros resultados preliminares hablan de un aumento enel porcentaje de pacientes que alcanzan respuesta patológica completa, respuesta clínica completa y preservación anal. (227)

Tabla 6. Principales ensayos clínicos de radioterapia de larga y corta duración con quimioterapia e inmunoterapia.

Ensayo	NCT	Fase	Estadio	Tratamiento	% pCR
Voltage-A	NCT02948348	Ib	III	RT x 25 sesiones + (QT+Nivolumab) x 5 ciclos → Qx	30
NSAB FR-2	NCT03102047	II	III	RT x25 sesiones + QT→ Durvalumab (750 mg) x 4 ciclos → Qx	22.2
AVANA	NCT03854799	II	III	Capecitabina (850 mg) + RT x 28 sesiones + avelumab x 6 ciclos → Qx	23
R-IMMUNE	NCT03127007	Ib	III	5-FU (225 mg/m^2) + RT x 25 sesiones + atezolizumab x 4 ciclos →Qx *vs* 5-FU (225 mg/m^2) + RT x 25 sesiones → Qx	24
Averectal	NCT03503630	II	III	RT x 5 sesiones → Folfox+Avelumb x 6 ciclos → Qx	37.5

Para aquellos pacientes que presenten tumores rectales no resecables o bien en aquellos pacientes que por su condición basal o su avanzada edad no pueden someterse a la cirugía radical, se está estudiando el empleo de la braquiterapia endorectal con Iridio- 192 como una opción de tratamiento tanto en tumores en estadios tempranos como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

localmente avanzados. Los resultados preliminares obtenidos reflejan un porcentaje mayor de pacientes con respuesta clínica completa cuando esta se administra como potenciador de la EBRT, especialmente en estadios tempranos. No obstante, sus beneficios a largo plazo deben ser estudiados antes de su posible estandarización. (228)

En lo que respecta a los adenocarcinomas de colon, la radioterapia no está indicada para su tratamiento en fase no metastásica en tanto que por su disposición anatómica la cirugía radical da lugar a una mayor garantía de resección completa del tumor presentado una tasa de recurrencia muy inferior al adenocarcinoma rectal. (206)

Cuando hablamos de enfermedad metastásica, la radioterapia se empleará principalmente de forma paliativa en el tratamiento y alivio de síntomas tales como el dolor, el sangrado o las obstrucciones, aunque en aquellos casos donde las metástasis sean únicas o localizadas podrá emplearse como tratamiento radical de estas.

En el primero de los supuestos, la dosis y frecuencia de la radioterapia serán prescritas de acuerdo con las características propias del paciente. En el segundo supuesto, la SBRT se convierte en la modalidad recomendada por ASCO y SEOM tras haber demostrado en ensayos clínicos como el COLD3 (NCT00914615) o estudios como los de Ji et al. (2021) un mayor control de la enfermedad, y aumento en la calidad de vidaen el tratamiento de metástasis únicas, así como de oligometástasis, siempre y cuando estas no sean resecables mediante cirugía. Actualmente se están poniendo en marcha ensayos clínicos como el SIRIUS (NCT05375708) para estudiar la efectividad de la asociación de quimioterapia sistémica a la SBRT. (208,229,230)

El hígado es el principal órgano afectado por metástasis en pacientes con cáncer colorrectal. La SBRT es una alternativa de tratamiento en estos pacientes, y también se ha evidenciado que el empleo de braquiterapia con yttrium-90 junto con fluorouracilo retrasa la progresión de la enfermedad en mayor medida en este órgano, aunque al ser una técnica más invasiva debe reservarse a aquellos pacientes que presenten una mejor condición general. (229)

3.2.4. Tratamiento sistémico: quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida

Del mismo modo que ocurría en el caso de los adenocarcinomas de pulmón, pese a los buenos resultados que se obtienen mediante el tratamiento con cirugía radical, la tasa de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

recurrencia a los cinco años tras la cirugía radical en estadios avanzados (III) se sitúa en un 45-65% en tumores de colon y entre un 30-44.6% en los tumores rectales. (231,232)

Este hecho, sumado a los casos en los que los tumores son diagnosticados como no resecables y/o metastásicos ponen a la terapia farmacológica sistémica como agente terapéutico principal en el tratamiento de los adenocarcinomas colorrectales en fase avanzada.

Como ya se ha venido comentado en apartados anteriores, el empleo de fármacos sistémicos en neodayuvancia y/o adyuvancia ha demostrado mayores beneficios en términos de supervivencia y tiempo libre de progresión en comparación con la cirugía radical como única terapia.

En el caso de los adenocarcinomas rectales (pMMR/MSS), el tratamiento neoadyuvante estandarizado se compone principalmente de radioterapia de curso corto (aprox. 5 fracciones) o CCRT con 5-FU o capecitabina (presentando mejores resultados de pCR y R0) seguido de aproximadamente 4 ciclos de quimioterapia basada en platino (esquema FOLFOX, CAPEOX o FOLFIRINOX), habiendo demostrado ambas estrategias de tratamiento la misma eficacia en el control local de la enfermedad, disminuyendo la tasa de recidiva local a un 5%. Para los adenocarcinomas de colon (pMMR/MSS), al no poder ser radiados, el tratamiento estandarizado será la quimioterapia exclusivamente, siendo los esquemas de tratamiento más empleados CAPEOX y FOLFOX. (233,234,235)

Por su parte, la terapia adyuvante con quimioterapia en adenocarcinomas colorrectales fue evaluada en numerosos estudios con el fin de reducir la tasa de recaída a medio y largo plazo. Desafortunadamente, todos los ensayos clínicos exceptuando el ADORE (NCT00807911) no demostraron beneficio en el empleo de terapia adyuvante, no habiéndose podido aún estandarizar su uso empleándose la vigilancia activa de estos pacientes tras la cirugía. No obstante, en la actualidad, ensayos como el FANTASTIC (NCT04338191) se encuentran evaluando los beneficios de la terapia adyuvante en este contexto. (236,237,238)

En lo que respecta a la inmunoterapia, esta no ha demostrado eficacia en tumores pMMR/MSS. Estos tumores se asocian con una carga mutacional baja y una presencia muy baja o nula de neoantígenos asociados a mutaciones capaces de activar a los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). Este microambiente tumoral favorece la

USC DE COMPOSTELA

resistencia a los fármacos de punto de control inmunitario, reduciendo las posibilidades terapéuticas de los pacientes con este tipo de tumor. (227,239)

Para sobreponerse a esta limitación se están desarrollando numerosos ensayos clínicos en los que hasta la fecha no se ha evidenciado beneficio en el empleo de inmunoterapia en monoterapia. No obstante, tras conocerse que la RT induce la muerte inmunogénica (DCI) de las células tumorales; libera señales proinflamatorias, como neoantígenos y patrones moleculares asociados al daño (DAMP); y promueve la activación de células T antitumorales y la acumulación de TILs. Todo esto, conduce a la regulación positiva de la expresión de PD-L1 en el tejido, aumentando la sensibilidad a la inmunoterapia. (227,239)

Es por ello, que la radioterapia combinada con un fármaco anti PD-L1 regula el microambiente tumoral disminuyendo su efecto supresor aumentado la presencia de citoquinas antitumorales derivadas de células T. Siguiendo esta línea, se están desarrollando múltiples ensayos clínicos especialmente en neoadyuvancia con diferentes esquemas, habiendo reportado el máximo grado de regresión tumoral aquellos que combinan radioterapia con quimioterapia e inmunoterapia, aunque la mejor secuencia de administración de estos sigue siendo incierta.(227,239)

Desafortunadamente, los pacientes con adenocarcinomas de colon, (pMMR/MSS) al no poder ser radiados, no podrán beneficiarse de la terapia inmunológica en este contexto, lo que supondrá una desventaja terapéutica y un peor pronóstico. (240)

Todo lo contrario, ocurre en el microambiente de los adenocarcinomas colorrectales que sí presentan inestabilidad de microsatélites (dMMR/MSI-H). La elevada presencia de neoantígenos asociados a mutaciones junto con la consiguiente activación de TILs permitió observar en los ensayos NICHE (NCT03026140) y PICC (NCT03926338) un aumento de la pCR de hasta el 60% en aquellos pacientes que recibieron tratamiento con un fármaco de punto de control inmunitario en monoterapia. (227, 241,242)

Por todo ello, la inmunoterapia se ha convertido en el pilar del tratamiento de este tipo de tumor, habiéndose estandarizado el empleo de fármacos como el nivolumab, el pembrolizumab o el dostarlimab en neoadyuvancia. No obstante, los tumores dMMR/MSI-H representan solamente un 5% del total de adenocarcinomas colorrectales, por lo que centrar los esfuerzos en conseguir tratamientos en monoterapia

USC DE COMPOSTELA

con fármacos de punto de control inmunitario para pacientes con tumores pMMR/MSS toma gran importancia. (227)

En lo que respecta a al tratamiento adyuvante, los beneficios del empleo de inmunoterapia son aún desconocidos, por lo que el tratamiento indicado si se alcanza la pCR será la vigilancia activa, mientras que si no se alcanza será alguno de los siguientesesquemas de quimioterapia (hasta un máximo de 6 meses), dependiendo del grado de extensión del tumor y de las terapias previas: FOLFOX, CAPEOX, 5-Fu o capecitabina.(233,235,243)

No obstante, ensayos clínicos como el ATOMIC (Alliance A021502) (NCT02912559) se encuentran evaluando la eficacia de la combinación de atezolizumab y quimioterapia (FOLFOX) frente al empleo de únicamente quimioterapia (FOLFOX). Aunque aún no está disponible, la evaluación positiva de este ensayo demostraría una mejora en la erradicación de enfermedad micrometastásica ante el empleo de inmunoterapia en pacientes con tumores en estadio III, pudiendo incluso implicar un cambio en la práctica clínica habitual. (244)

Aunque conocer la presencia o ausencia de inestabilidad de microsatélites es un factor determinante a la hora de prescribir un tratamiento sistémico, también es altamente recomendable determinar el resto de posibles alteraciones genéticas para las cuales exista una terapia dirigida.

Actualmente, en este contexto de enfermedad avanzada no metastásica, se han llevado a cabo ensayos clínicos con terapias dirigidas especialmente anti-EGRF (cetuximab) y anti-VEGF (bevacizumab) con el fin de evaluar la posible sinergia positiva de estos fármacos con los esquemas de quimioterapia ya estandarizados tanto en neoadyuvancia como en adyuvancia, no habiéndose evidenciado aumento en el tiempo libre de progresión ni en la tasa de respuesta patológica completa, no siendo por tanto recomendados por las guías clínicas en este estadio tumoral. (245)

Si hablamos de enfermedad metastásica (estadio IV), determinar el patrón mutacional del tumor será crucial para la correcta elección del tratamiento tanto en aquellos pacientes que debuten con enfermedad *de novo* metastásica como en aquellos que hayanprogresado a algún tratamiento previo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Actualmente el tratamiento estandarizado en primera línea en tumores que no presentan mutaciones somáticas de los genes *KRAS, NRAS* o *BRAF* ni inestabilidad de microsatélites, es la quimioterapia (FOLFOX, CAPEOX, FOLFIRI, FOLFIRINOX) en monoterapia o en combinación con alguna terapia dirigida (bevacizumab, cetuximab o panitumumab). En la mayoría de los casos, la quimioterapia estará basada en fluoropirimidinas y las terapias dirigidas se utilizarán o no dependiendo del estado funcional del paciente y de las características del tumor. (233,235,246)

Ninguna de estas terapias dirigidas al ser comparadas ha presentado inferioridad estadísticamente significativa frente al resto, aunque cabe destacar que bevacizumab ha reportado mayores beneficios en cuanto al tiempo libre de progresión y a la supervivencia global en tumores situados en el lado derecho del colon, mientras que panitumumab y cetuximab lo han hecho en pacientes con tumores en el lado izquierdo, aunque en cuestión de toxicidad no presentan diferencias significativas. (246, 247)

En el caso de los pacientes con tumores que presentan mutaciones positivas de los genes *RAS* o *BRAF*, el empleo de terapia dirigida anti-EGFR está desaconsejado al presentar resistencia a los mismos. En estos casos, la terapia estandarizada será la quimioterapia con o sin bevacizumab tras haber presentado un mayor tiempo libre de progresión, así como una mayor supervivencia global en los ensayos clínicos CAIRO2(NCT00208546) y PACCE (NCT00115765) cuando no se han asociado con ningún anti-EGFR. (246,248,249,250)

Por su parte, para aquellos pacientes cuyos tumores si presenten inestabilidad de microsatélites independientemente de la presencia o ausencia de mutaciones en *KRAS* o *BRAF*, la FDA aprobó en 2020 basándose en el ensayo clínico KeyNote-177 (NCT02563002) el tratamiento en monoterapia con el fármaco de punto de control inmunitario pembolizumab (anti-PD-L1) tras haber demostrado superioridad entérminos de supervivencia libre de progresión siendo esta de 16,5 meses frente a 8,2 en el grupo de pacientes tratados con terapia convencional. (251,252,253)

A raíz de los resultados del ensayo KeyNote-177 (NCT02563002) se están desarrollando numerosos ensayos clínicos para testar la eficacia de otros fármacos de punto de control inmunitario en este mismo contexto terapéutico. Algunos ejemplos sonel CheckMate 8HW (NCT04008030) para nivolumab y nivolumab en combinación con ipilimumab o el COMMIT (NCT02997228) para atezolizumab. (254,239,255)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Para aquellos pacientes cuyos tumores presenten inestabilidad de microsatélites y ya han recibido inmunoterapia o no son candidatos para recibirla el tratamiento en primera línea en el contexto de enfermedad metastásica será el mismo que el descrito anteriormente para los tumores con estabilidad de microsatélites. (233,235)

Si la enfermedad progresa, una segunda línea de tratamiento sistémico estará indicada tanto en tumores dMMR/MSI-H como pMMR/MSS siempre y cuando no existan comorbilidades limitantes. La elección de tratamiento dependerá principalmente dela/las terapias previas que se hayan administrado y del estado funcional del paciente. (249)

En aquellos pacientes con tumores que presentan estabilidad de microsatélites si la terapia en primera línea estaba basada en oxaplatino se recomienda el empleo de irinotecán o una fluoropirimidina en monoterapia, por el contrario, si la primera línea se basó en irinotecán, se recomienda el tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX o CAPOX). (233,235,246)

Del mismo modo que ocurría en la primera línea, los tratamientos dirigidos cetuximab y panitumumab han demostrado mayor eficacia en lo que respecta al tiempo libre de progresión, no así en cuanto a la supervivencia global, aunque su empleo sigue estando recomendado bajo las mismas condiciones que en la primera línea en aquellos pacientes cuya enfermedad no haya progresado previamente a estas terapias. (256,257)

En cuanto a las terapias dirigidas antiangiogénicas, el ensayo RAISE (NCT01183780) demostró superioridad en cuanto a la supervivencia global y al tiempo libre de progresión de ramucirumab y aflibercept en combinación con FOLFIRI en pacientesque cuya enfermedad ha progresado tras recibir bevacizumab independientemente de su estatus mutacional de *KRAS*. (246,258)

Si hablamos de los pacientes con mutaciones en *BRAF* (V600E), un nuevo fármaco llamado encorafenib que actúa bloqueando la vía de señalización de este gen ha demostrado en combinación con cetuximab y binimetinib un aumento de la respuesta tumoral del 1,8 en el brazo control al 26,8 en el brazo experimental, así como un aumento de la supervivencia global de 5,9 a 9,3 meses, consiguiéndose la aprobación deesta combinación en segunda línea en adenocarcinoma colorrectal independientemente de su estabilidad microsatelital y dando lugar al desarrollo de más ensayos clínicos para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aprobar esta combinación en las primeras fases de la enfermedad metastásica. (246,256,259)

Con respecto a los tumores dMMR/MSI-H el tratamiento aprobado en segunda línea es ipilimumab en combinación con nivolumab, aunque tras los buenos resultados ya mencionados de pembrolizumab y encorafenib en combinación con cetuximab actualmente se está investigado el potencial de la combinación de estos fármacos en segunda línea a través de ensayos clínicos como el SEAMARK (NCT05217446) aunque todavía no hay resultados disponibles. (260)

Si tras recibir alguna de estas terapias la enfermedad progresa nuevamente el tratamiento en tercera línea metastásica y sucesivos se contemplará siempre y cuando el paciente presente un estado funcional adecuado y no presente toxicidades limitantes derivadas de los tratamientos previos. (233,235)

En este contexto clínico, los tratamientos contemplados en las guías clínicas son principalmente: anti-EGFR o anti-HER2, el regorafenib y el TAS-102. Dentro del grupo de los anti-EGFR tanto cetuximab como panitumumab en monoterapia presentaron mejor supervivencia global frente al mejor tratamiento de soporte, aunque solamente lo hicieron en aquellos pacientes que no presentan mutación en los genes *RAS* ni *BRAF*. Para aquellos tumores que si presenten mutación positiva de *BRAF* V600E el fármaco indicado será encorafenib. (233,235,246,261)

Si hablamos de los fármacos anti-HER2, estos son raramente empleados en CRC ya que menos de un 5% de los pacientes presentan una amplificación de este gen. Algunos fármacos como el trastuzumab, el pertuzumab o el lapatinib han sido testados en el contexto metastásico, concluyéndose que ninguno de ellos presenta beneficio en monoterapia, no así en combinación. Actualmente una nueva generación de fármacos como el tucatinib o el deruxtecan, así como sus posibles combinaciones están siendo evaluadas a través de ensayos habiendo sido hasta la fecha la combinación de tucatinib y trastuzumab la que presentó una mejor media de tiempo libre de enfermedad, así como de supervivencia global en pacientes con *RAS* y *BRAF* nativos. (246,262)

Con respecto al inhibidor multiquinasa regorafenib, y al inhibidor de VEGFR fruquintinib ambos demostraron superioridad frente al mejor cuidado de soporte en los ensayos CONCUR (NCT01584830), FRESCO (NCT02314819) y FRESCO-II (NCT04322539) respectivamente, aunque presentando un mayor tiempo libre de

USC DE COMPOSTELA

progresión y supervivencia global los pacientes tratados con regorafenib. Estos fármacos presentaron mejor beneficio en pacientes con mutación positiva de *RAS*. (261)

Por su parte, el fármaco TAS-102 (trifluridina y clorhidrato de tipiracilo) en monoterapia ha demostrado una supervivencia libre de progresión y una supervivencia global superior frente a placebo en varios ensayos clínicos especialmente en pacientes con mutación positiva de *RAS*. (246,261)

A través de estos datos, podemos resaltar la necesidad de estudiar las posibles sinergias entre estos grupos farmacológicos para así disponer de un mayor rango terapéutico. Algunos de los ensayos clínicos que actualmente se están desarrollando en Europa para investigar estas combinaciones pueden verse en la tabla 7. (246,261)

Tabla 7. Ensayos clínicos en desarrollo para la evaluación de posibles sinergias entre dianas terapéuticas en CRC

Ensayo	NCT	Fase	Tratamiento	Objetivo
NEXT-REGIRI	NCT03829462	III	Regorafenib + irinotecan *vs* regorafenib	OS
RAMTAS	NCT03520946	II	Ramucirumab + TAS-102 *vs* TAS-102	OS
MAYA	NCT03832621	II	Nivolumab + ipilimumab + temozolomide	PFS
NSABP FC-11	NCT03457896	II	Neratinib + cetuximab *vs* trastuzumab	PFS
-	NCT03475004	II	Pembrolizumab + binimetinib + bevacizumab vs binimetinib + bevacizumab	ORR
-	NCT03576963	I-II	Nivolumab + guadecitabine	ORR

3.2.5. Evaluación de la respuesta tumoral. Criterios de seguimiento de la progresión y resistencia farmacológica a través de técnicas multiómicas

Del mismo modo que ocurría con el adenocarcinoma de pulmón, pese a los esfuerzos realizados en las últimas décadas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, aproximadamente ente un 30-50% de los pacientes sufrirán una recaída presentando una tasa de supervivencia a los 5 años de aproximadamente el 50%. (263)

Convencionalmente, el seguimiento y evaluación de la respuesta tumoral se realizará a través del empleo de los criterios RECIST 1.1 e iRECIST sobre imágenes obtenidas por PET-CT con contraste 18F-FDG y/o CT-CAP con una periodicidad marcada por el tipo de tratamiento que se haya o se esté administrando al paciente y/o la fase de la enfermedad. En aquellos pacientes cuya enfermedad se encuentre en remisión el

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

seguimiento de la progresión también podrá hacerse mediante colonoscopia exploratoria. (263)

Este seguimiento de la respuesta tumoral por imagen puede complementarse con el seguimiento mediante biomarcadores en sangre como el CEA o el CA19-9. Si hablamos del CEA, los últimos estudios y metaanálisis realizados, recomiendan una monitorización seriada (presenta un 70-80% de sensibilidad) de este biomarcador parala detección temprana de la recurrencia tumoral. (264,265)

Estos análisis, comenzarían con una medición antes del inicio del tratamiento (valores >5 µg/L estarán relacionados con un peor pronóstico) y seguidamente cada 3 meses durante el tratamiento activo, así como durante los siguientes dos años tras el fin de tratamiento. Una de las mayores aportaciones del análisis seriado del CEA ha sido la capacidad para detectar las metástasis quirúrgicamente resecables cuando se realiza juntamente con el seguimiento por imagen en una proporción superior que mediante cualquiera de las dos técnicas por separado. (264,266)

Así mismo, valores en suero de CEA se normalizan aproximadamente a las 6 semanas tras la resección quirúrgica, por lo que valores permanentemente elevados podrán indicar presencia de tumor residual o recurrencia. También, se han relacionado valores crecientes de CEA como precedente a la progresión clínica, lo que daría lugar a la sospecha temprana de recurrencia. (263)

En lo que respecta al seguimiento de la progresión tras los dos primeros años, las guías clínicas recomiendan el análisis del CEA durante cinco años más con una periodicidad anual o bianual basándose en los datos sobre detección de recidiva indexados en la base de datos ACCENT. (263)

Aunque el biomarcador CEA presente una mayor especificidad en adenocarcinoma colorrectal en comparación con el adenocarcinoma de pulmón, este nunca podrá utilizarse como herramienta diagnóstica única por lo que en los últimos años se están investigando nuevos marcadores que sí presenten este potencial.

Entre estos nuevos potenciales biomarcadores, destacan las biomoléculas cfDNA, ctDNA, CTCs, miRNA o los exosomas entre otras. Si hablamos del cfDNA y más concretamente de su fracción representante del tumor el ctDNA, la concentración en plasma variará dependiendo de las características clínicas y patológicas del cáncer,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

incluido el estadio, la carga tumoral, la localización, la vascularización, la respuesta a la terapia y la actividad metabólica propia del tumor. En el caso de los adenocarcinomas colorrectales los valores de ctDNA pueden elevarse hasta 50 veces por encima del valor normal (10ng/mL). (267)

El ctDNA presenta una vida media muy corta, por lo que su detección en sangre captura la carga tumoral en tiempo real, indicándonos caídas abruptas en sus valores una clara respuesta a la terapia empleada. Del mismo modo, esta biomolécula es detectable en presencia de una cantidad de masa tumoral muy inferior en comparación con el CT, por lo que niveles crecientes de ctDNA pueden presagiar una recurrencia radiológica con meses de antelación, ocurriendo este mismo fenómeno con las CTCs. También cabe destacar que su mayor sensibilidad y especificidad con respecto al CEA la convierte en potencial candidata para convertirse en el biomarcador estandarizado. (267,268)

Si bien las concentraciones en sangre de ctDNA ya son de gran relevancia para el seguimiento de la enfermedad, el estudio mediante técnicas multiómicas de sus características permitirá identificar otras alteraciones de interés clínico.

Un ejemplo de ello sería el análisis de las metilaciones presentes en el ctDNA. En el caso del adenocarcinoma colorrectal destacarían la presencia de metilación en SEPT9 íntimamente relacionado con la división celular descontrolada. Esta alteración se relaciona directamente con la progresión de la enfermedad llegando a estar presente en el 100% de pacientes con tumores en estadio IV. (269)

Otras metilaciones de interés en CRC son las de *IKZF1, APC* y *BACAT1* que indicarían presencia de enfermedad residual tras la cirugía y por tanto un mayor riesgo de recurrencia. Por su parte, la presencia disminuida de metilaciones en HPP1 se correlaciona con un riesgo reducido de progresión de la enfermedad. (269)

En términos de supervivencia, Nassar et al. (2021) muestra que los estudios llevados a cabo por Xie et al. y Barault et al. relacionaron la presencia de hipermetilación en *FER1L4, VAV3, CHST2, DTX1, PDGFD, SMBT2, QKI, ZNF568, ANKRD13B, ZNF671, CNNM1, GRN2D,* con presencia de enfermedad metastásica y de *EYA4, GRIA4, ITGA4, MAP3K14-AS1, MSC* con un alto riesgo de progresión tras el tratamiento con regorafenib. Todas estas alteraciones se asocian a peores tasas desupervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. (269)

USC DE COMPOSTELA

Los miRNA son otras moléculas de interés en la monitorización del tumor. Valores elevados de miRNAs como miR-18a, miR-155 y miR-205-5p se han relacionado con represión de la proliferación, migración e invasión celular, mientras que valores elevados de miR-494, miR-598 y miR-17-3p han puesto de manifiesto todo lo contrario, convirtiéndose en potenciales marcadores de progresión de la enfermedad y mal pronóstico. (270)

También, los miRNA permiten realizar un seguimiento estrecho de le evolución del tumor al haber sido relacionado con la presencia de metástasis ganglionar (miR-548c- 5p, miR-548i y miR-548am-5p), la recurrencia tumoral tras cirugía radical (hsa-mir- 191, hsa-mir-200b, hsa-mir-30b, hsa-mir-30c2, hsa-mir-33a, hsa-mir-362, hsa-mir-429y hsa-mir-744) o la presencia de enfermedad residual en los márgenes quirúrgicos (miR-18a, miR-21, miR-182 and miR-183). Así mismo, valores irregulares de miRNA nos ayudan a inferir la presencia de mutaciones génicas como en el caso de *BRAF* en el que el valor de miR-31se encuentra aumentado y el de miR-373 disminuido. (270)

Recientes estudios, han demostrado la estabilidad de esta molécula en sangre periférica, llegándose a proponer un panel diagnóstico con los 5 miRNAs (miR-31, miR-141, miR-224-3p, miR-576-5p and miR-4669) cuyos valores presentan mayores discrepancias en comparación con los controles sanos. De entre los miRNAs presentes en sangre, destacan los exosomales como por ejemplo la elevación de miR-6803-5p que se ha relacionado con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y el hígado, así como con una baja supervivencia libre de progresión o el miR-21 que se ha relacionado con un mayor índice de recurrencia en todos los estadios tumorales. (270,271,272)

El empleo de técnicas multiómicas, también ha propiciado un avance significativo en el conocimiento de la interacción que se produce entre los fármacos antineoplásicos y el tumor, desentrañándose numerosos mecanismos de resistencia farmacológica (hecho que limita hasta en un 90% la eficacia del tratamiento en pacientes con CRC) así como los mecanismos para superarla, procurando esto el desarrollo de terapias más precisas y eficaces. (273)

El tratamiento principal farmacológico del CRC es la quimioterapia. Estos medicamentos contra el cáncer primero se metabolizan en una forma activa, luego se transportan a la ubicación adecuada y se usan en el objetivo apropiado, lo que finalmente conduce a la muerte de las células tumorales. La aberración de estos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

procesos podría dar lugar a la aparición de farmacorresistencia en el tratamiento del cáncer y reducir significativamente su utilidad. Así mismo, habrá de tenerse en cuenta la interacción de estos fármacos con el microambiente tumoral. (274)

La quimioterapia basada en fluoropirimidinas es el tratamiento principal del CRC. La resistencia al 5-FU viene dada principalmente por la alteración en la inhibición de la enzima timidato sintetasa (TS), pieza clave para desencadenar la reacción que en último término da lugar a la correcta síntesis y reparación del DNA y que por tanto estará directamente relacionada con el metabolismo y la activación de este fármaco. (273,274,275)

En las células resistentes a 5-FU, se encontraron aumentados los niveles de mRNA de TS, lo que llevó a una mayor actividad catalítica esta enzima y por tanto a una mayor actividad de reparación celular y una menor efectividad del fármaco. También, se observaron niveles reducidos de miR-506 y miR-26b y elevados de miR-195. Otros mecanismos de resistencia incluyen la disminución de la activación intratumoral de su nucleótido y el aumento de la degradación sistémica por la dihidropirimidina deshidrogenasa. (274,270)

Para sobreponerse a esta resistencia, este fármaco fue combinado con otros agentes citostáticos como el oxaliplatino o el irinotecan o bien con el análogo del ácido fólico leucovorina. Aunque la supervivencia global aumentó con estas combinaciones, también aparecieron mecanismos de resistencia a estos fármacos. La resistencia al irinotecán se asoció principalmente a su degradación sistémica por las enzimas del citocromo P450 o a la conjugación por la UDP-glucuronil transferasa, mientras que la resistencia al oxaliplatino al igual que ocurría en el caso del adenocarcinoma de pulmón se asoció con una mayor reparación de los aductos de oxaliplatino-DNA por parte de la enzima reparadora ERCC1 y ante ello se observaron niveles reducidos de miR-143. (274,270)

Con respecto a los dos fármacos directamente relacionados con esta familia de las fluoropirimidinas, la capecitabina al necesitar convertirse en 5-FU para ser activa presentará mecanismos de resistencias muy similares a los descritos para 5-FU, mientras que la resistencia a TAS-102 se piensa que podría estar relacionada con la disminución en la incorporación de antimetabolitos a la cadena de DNA probablemente mediado por TS. (274,275,276)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez más, para superar la resistencia de las anteriores combinaciones con base fluorouracilo, se establecieron nuevas combinaciones de este fármaco con anti-VEGF y anti-EGFR, aunque para estos también se presentaron mecanismos de resistencia. En el caso de los anti-VEGF el mecanismo principal no se conoce, aunque se sospecha que podría estar relacionada con la activación de la vía de HGF/c-MET relacionada con la proliferación y la angiogénesis celular. (275)

Por su parte, el mecanismo de resistencia de los anti-EGFR se ha visto relacionado con la activación aberrante de la propia vía de señalización de EGFR, así como de las vías RAS-RAF-MAPK, PI3K-PTEN-AKT y JAK/STAT que cursan con la presencia de mutaciones en los genes *EGFR, RAS* o *BRAF*, la amplificación de *HER2*, o alteraciones del ctDNA de los genes *KRAS, NRAS, MET, ERBB2, FLT3, EGFR,* y /o *MAP2K1*. Este mecanismo de resistencia se ha visto reflejado en la sobreexpresión de miR-100/125b. Actualmente se están desarrollando nuevos anticuerpos monoclonales anti-EGFR para superar esta resistencia. (275, 277, 278)

En lo que respecta a los anti-HER2 el mecanismo de resistencia está mediado por la presencia de mutaciones los genes *HER2, RAS* y *BRAF*, aunque los mecanismos subyacentes son todavía desconocidos. Actualmente, la estrategia principal que se está desarrollando para sobreponerse a esta resistencia es el desarrollo de fármacos que inhiban dualmente los genes *HER2* y *EGFR*. (275, 277)

Finalmente, si hablamos de la inmunoterapia de punto de control inmunitario, los mecanismos de resistencia intrínsecos son compartidos con los del adenocarcinoma de pulmón descritos en el apartado 3.1.4 de este manuscrito, siendo característico de los CRC una expresión inusualmente baja de MHC-I. Para ampliar la información referente a los mecanismos de resistencia de este y del resto de grupos farmacológicos expuestos, así como las terapias en desarrollo para sobreponerse a los mismos consultar tabla 8. (279)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 8. Principales mecanismos de resistencia a las terapias dirigidas en CRC, estrategias para superarlos y principales fármacos en desarrollo por diana terapéutica.

Grupo farmacológico	Mecanismos de resistencia	Estrategias anti-resistencia	Fármacos en desarrollo
EGFR	-Mutaciones en EGFR, RAS o BRAF -Amplificación de HER2 -Alteraciones del ctDNA de *KRAS*, *NRAS*, *MET*, *ERBB2*, *FLT3*, *EGFR*, y *MAP2K1*	-Nuevos mAbs anti-EGFR -Proteínas recombinantes anti-EGFR y anti-HER2 -Fármacos contra KRAS-mut	-Erlotinib -Gerfitinib -Afatinib -Neratinib -Sapitinib -Doligotuzumab
HER2	-Mutaciones de RAS o BRAF -Mutaciones de HER2	-Inhibición dual de HER2 y EGFR -Terapia combinada dirigida a KRAS, BRAF y EGFR -Terapia combinada dirigida a HER2 y PD-1	-Napatinib -Sapitinib -Trastuzumab -Tucatinib -Disitamab-Vedotin -Trastuzumab-emtansine
VEGFR	-Activación de la vía HGF/c-MET -Regulación positiva de las vías angiogénicas -Activación de vías compensatorias	-Terapia combinada dirigida a VEGF y PD-1 - Terapia combinada dirigida a MET y VEGF	-Vanuzizumab -Sorafenib -Vatalamib -Famitinib -Ramucirumab -Levantinib -Fruquitinib
BRAF	-Sobreexpresión de EGFR -Mutación de BRAF V600E -Activación de MAPK	-Terapia combinada dirigida a BRAF y EGFR - Terapia combinada dirigida a MEK y BRAF - Terapia combinada dirigida a BRAF, EGFR y MEK	-Vemurafenib -BMS-908662
Inmunoterapia	-Expresión aberrante de antígenos tumorales -Secreción de moléculas inhibitorias por parte del tumor -Alteraciones en la presentación antigénica -Vascularización anormal del tumor	-Aumento de la infiltración de células T en el tumor -Terapia combinada dirigida a EGF y PD-1 -Inhibición dual de PD-1/PD-L1 y CTLA-4	-Camrelizumab -Trislelizumab -Nivolumab -Pembrolizumab -Tremelimumab

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hipótesis y objetivos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 2: Hipótesis y objetivos

La notable incidencia y prevalencia de los adenocarcinomas pulmonares y colorrectales en los últimos años ha precipitado un aumento en la demanda por parte de clínicos y pacientes de nuevos tratamientos y herramientas diagnósticas más accesibles y efectivas.

Para dar respuesta a este desafío, la comunidad científica ha empleado un enfoque integrativo de las ómicas clásicas (genoma, proteoma, epigenoma) así como de las ómicas más vanguardistas (fosfoproteoma, lipidómica…) en la búsqueda de obtener un perfil holístico del desarrollo y comportamiento del tumor tanto ante estímulos internos como externos con la finalidad de proporcionar un mejor diagnóstico y de conocer qué terapia/as reportarán mayores beneficios a cada paciente en particular siendo este un salto cualitativo hacia la medicina personalizada y/o de precisión.

Siguiendo las líneas de este paradigma, este trabajo plantea dos hipótesis:

- Hipótesis 1: el empleo de técnicas multiómicas proporciona un análisis más completo y exhaustivo de las bases moleculares de los adenocarcinomas de pulmón y de los adenocarcinomas de colorrectales.
- Hipótesis 2: el empleo de técnicas multiómicas es de utilidad en la predicción de la evolución y pronóstico de los adenocarcinomas de pulmón y adenocarcinomas colorrectales.

Para probar estas hipótesis, se plantean los siguientes objetivos:

1. Establecer un circuito de recogida y procesamiento de muestras en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela que garantice la estandarización y trazabilidad de la recogida y análisis de las muestras independientemente del canal de procedencia del paciente.
2. Conformar una base de datos clínica de cada paciente que recoja los antecedentes médico-quirúrgicos, los hábitos tóxicos y nutricionales delpaciente, los datos relativos al proceso diagnóstico en el momento de la inclusión para cotejar su posible relación con los resultados obtenidos de las técnicas multiómicas, así como su impacto en la supervivencia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Describir posibles biomarcadores de adenocarcinomas de pulmón y colorrectales ya descritos previamente en la literatura o de nueva aparición.
4. Estimar la influencia de los hallazgos moleculares con la supervivencia libre de progresión y supervivencia global de los pacientes analizados en esta tesis.
5. Correlacionar los hallazgos de las técnicas multiómicas con las vías de señalización celulares para cada paciente individual.
6. Explorar posibles tratamientos adaptados en función de las alteraciones moleculares descritas en el análisis multiómico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Material y métodos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 3: Material y métodos

1. Diseño del estudio

Para la consecución de los objetivos planteados en el apartado anterior, se propone un estudio clínico, observacional, de tipo prospectivo, de cohorte longitudinal y unicéntrico para la obtención y análisis a través de técnicas mutiómicas de muestras de tejido sano y tumoral, así como de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma de pulmón y adenocarcinoma colorrectal en estadios tempranos previamente no tratados candidatos a cirugía radical cuyo fin sea establecer el perfil clínico-molecular de los pacientes e inferir la relevancia del mismo en términos de evolución y supervivencia.

El estudio se dividirá en tres fases: pre-cirugía, cirugía y post-cirugía. En la fase prequirúrgica se llevará a cabo el proceso de consentimiento informado, se recogerán los datos clínicos basales del paciente y se extraerá sangre periférica (con el paciente en ayunas, sin presencia de anestésicos en sangre). En la fase quirúrgica, se obtendrá el tejido tanto tumoral como sano y se recabarán los datos relativos al desarrollo de la cirugía. Durante la fase postquirúrgica se realizará un seguimiento del estado del paciente a través de la obtención de muestras de sangre periférica y de la actualización de los datos clínicos en cuatro visitas calendarizadas a la 3-4 semanas, 6 meses, 1 año y 2 años tras la cirugía.

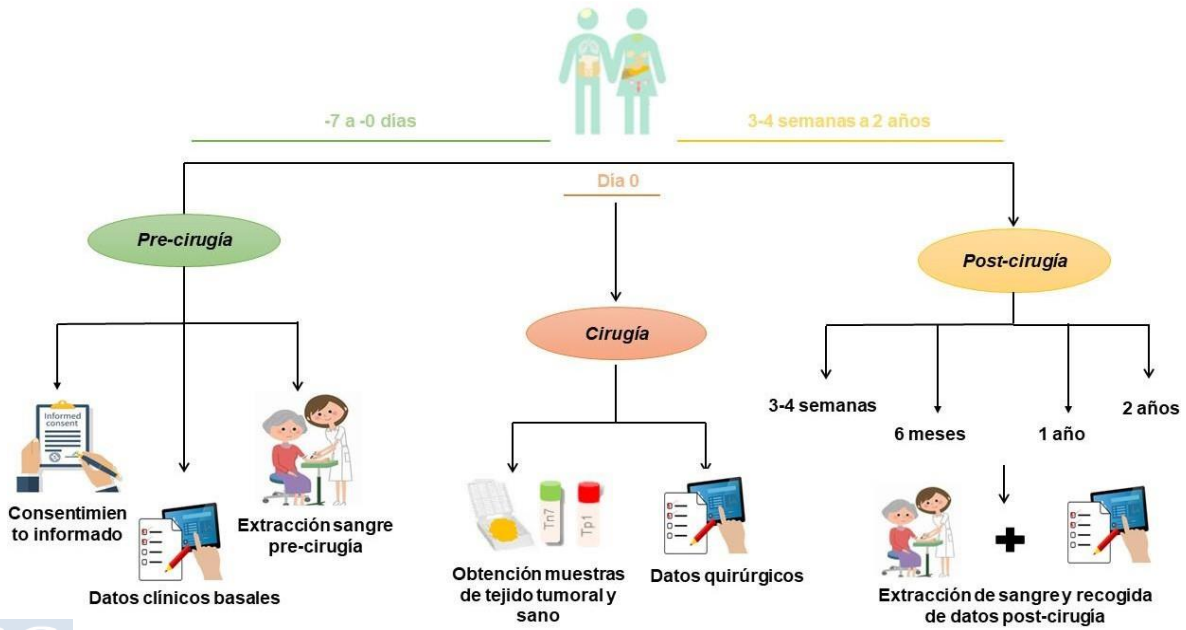


Figura 8 Diseño del estudio

2. Criterios de elegibilidad de pacientes

Un total de 14 pacientes fueron reclutados a través del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) entre septiembre de 2020 y marzo de 2021.

Los criterios de inclusión y exclusión se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 9. Criterios de elegibilidad

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
1. Ser mujer u hombre mayor de 18 años 2. Estar capacitado para entender y otorgar el consentimiento informado, así como para realizar los procesos propios del estudio 3. Tener un diagnóstico patológico y/o por imagen de adenocarcinoma de pulmón o adenocarcinoma colorrectal en estadio Ia III 4. Ser candidato a cirugía radical 5. No haber recibido ningún tratamiento para el cáncer actual 6. No tener historia clínica conocida o sospecha de padecer Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Hepatitis B, Hepatitis C, Virus del Linfocito T Humano (HTLV) o Sífilis 7. No haber recibido una transfusión sanguínea en los 15 días previos a la inclusión	1. No estar capacitado para entender ni otorgar el consentimiento informado, así como para realizar los procedimientos propios del estudio 2. No tener un diagnóstico patológico y/o por imagen de adenocarcinoma de pulmón o adenocarcinoma colorrectal 3. Presentar enfermedad metastásica (fase IV) 4. No ser candidato o rechazar someterse a cirugía radical 5. Haber recibido una transfusión sanguínea en los 15 días previos a lainclusión 6. Tener historia clínica conocida o sospecha de padecer Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Hepatitis B, Hepatitis C, Virus del Linfocito T Humano (HTLV) o Sífilis

3. Obtención de la base de datos clínicos del paciente

La obtención de los datos clínicos se llevará a cabo a través de la consulta de la historia clínica del paciente en el sistema informático IANUS así como de la entrevista personal con el mismo.

El siguiente es un resumen de las variables que se registrarán en las diferentes etapas del estudio (las plantillas de recogida de datos diseñadas y empleadas para el estudiopueden verse en el anexo 1):

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fase pre-cirugía:

- Datos demográficos: año de nacimiento, sexo, población.
- Historial médico: condición general, medidas antropométricas, hábitos dietéticos, actividad física, abuso de sustancias, exposición a tóxicos, medicamentos actuales, alergias a medicamentos, enfermedades y cirugías previas, procedimientos previos de detección de cáncer, antecedentes familiares de cáncer, enfermedad actual, síntomas y signos,
- Proceso diagnóstico: Diagnóstico prequirúrgico, grupo sanguíneo, marcadores tumorales, serología (VHB, VHC, VIH, HTLV y sífilis) hematología y bioquímica.

Fase quirúrgica:

- Recolección de muestras: información de cirugía, datos de recolección de sangre, datos de la resección del tumor, puntos temporales de isquemia, muestras sólidas.

Fase post-quirúrgica:

- Visita post cirugía: información al alta, complicaciones derivadas de la cirugía, recolección de muestras de sangre, diagnóstico patológico y estatus mutacional.
- Seguimiento a largo plazo: fecha, recolección de muestras de sangre, estado de seguimiento, progresión o recurrencia de la enfermedad, diagnóstico patológico, información sobre terapias adyuvantes, respuesta al tratamiento (RECIST) en caso de recurrencia, detección de rutina para marcadores tumorales, examen físico de rutina.

4. Obtención y análisis de las muestras de sangre

Las muestras de sangre venosa periférica o arterial (dos por cada extracción especificada en el apartado 1) serán recogidas en tubos de 10 mL tratados con anticoagulante EDTA K2 BD Vacutainer (núm. de catálogo: 366643). Esta sangre será procesada según se describe a continuación para la obtención final de plasma y células mononucleares periféricas (PBMCs). La sangre se extraerá con los tubos a temperatura ambiente y estos serán colocados inmediatamente en hielo para su conservación hasta suprocesamiento; este tiempo nunca deberá ser superior a cuatro horas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

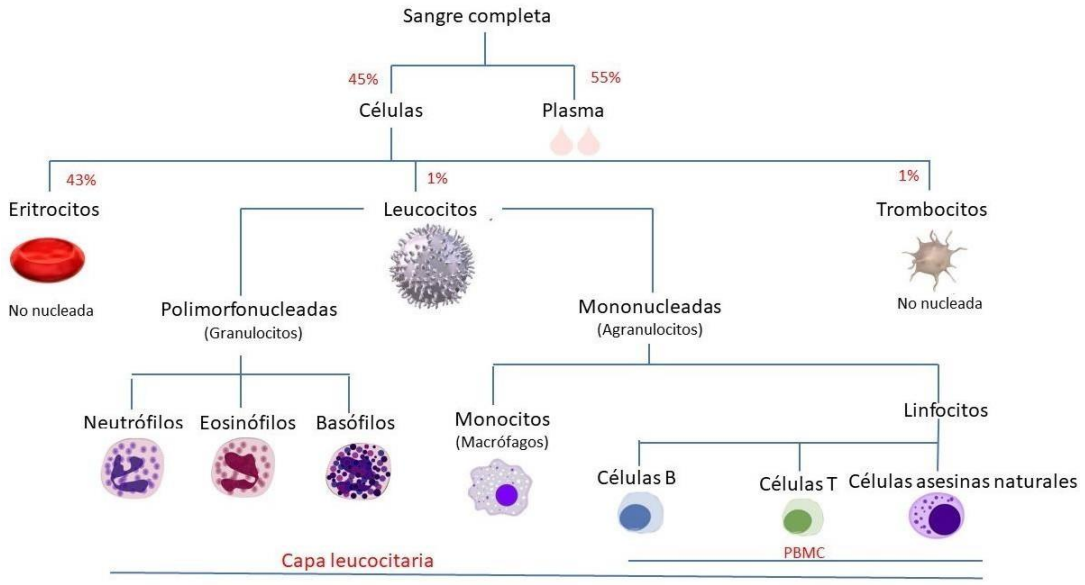


Figura 9. Componentes sanguíneos

El proceso de extracción de plasma y PBMCs, se iniciará con la centrifugación de los tubos de sangre completa a 1.500 x g (21ºC) durante 10 minutos con rotor sin freno (A-9, D1/D0). Este paso de centrifugación producirá 3 capas basadas en gradientes de productos sanguíneos, producidas por una combinación de peso, densidad y concentración del componente sanguíneo, siendo el plasma el más ligero y, por lo tanto, presentándose en la parte superior, quedando los hematíes en la parte inferior del tubo y entre ambas una capa leucocitaria.

El plasma de ambos tubos será aspirado cuidadosamente (dejando la punta de la pipeta aproximadamente 200 microlitros por encima de la capa leucocitaria) y transferido a un tubo cónico (núm. catálogo 62.554.100, Sarstedt™) de 15mL (nombrado como CT1). El resto de las capas de ambos tubos se trasferirá a un tubo cónico de 50mL (núm. de catálogo 62.547.100, Sarstedt™) (nombrado como CT2). CT1 y CT2 se conservarán en hielo durante el resto del proceso.

A continuación, el plasma contenido en CT1 será centrifugado a 3.000 x g (21ºC) durante 10 minutos con rotor sin freno (A-9, D1/D0). El resultado de esta centrifugacióndará lugar a dos capas, una superior y mayoritaria de plasma claro y una mínima cantidad de sedimento celular en el fondo. La capa de plasma claro será aspirada y depositada en crioviales de 1.6ml con tapa roja (núm. de catálogo 72.380.002, Sarstedt™) (8 x 1 ml) rotulados con una secuencia en la que los tres primeros dígitos

indicarán el código de nuestro centro (5C) y el número de paciente (1,2,3….), seguidamente se indicará el momento temporal al que pertenecen las muestras (pre para pre-cirugía, post para pos-tcirugía y FU1,FU2 y FU3 para los correspondientes seguimientos), identificando la parte final del código el contenido del criovial y su secuencia (1,2,3…) (P indicará plasma y C indicará células). Un ejemplo de esta nomenclatura sería 5C3-post-P4 que nos indicaría que este criovial contiene la cuarta muestra de plasma de las ocho obtenidas post-cirugía en el tercer paciente incluido en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Inmediatamente estos ocho crioviales serán congelados en nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo. Durante esta primera parte del proceso se recogerán los datos especificados en la plantilla 1.2 del Anexo 1. También se evaluará la hemólisis presente en el plasma según la escala colorimétrica recogida en la figura 1.3, descartándose aquellas muestras que presenten una concentración de hemoglobina superior a 250mg/dL.

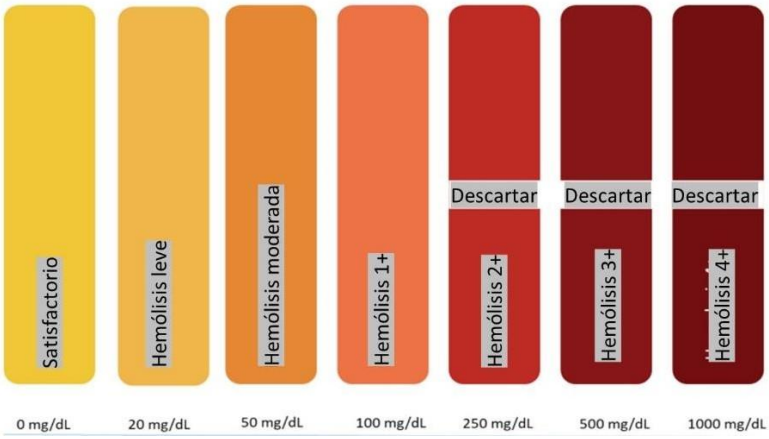


Figura 10. Escala colorimétrica de hemólisis en suero sanguíneo humano

Una vez obtenido el plasma, se procederá con el aislamiento de las PBMCs. Para ello, se resuspenderá el sedimento celular contenido en CT1 y se unificará con el contenido que previamente se había depositado en CT2. A continuación, se realizarán tres lavados del contenido de CT2 con solución salina tamponada con fosfato (DPBS) libre de calcioy magnesio.

El primer lavado se realizará añadiendo DPBS al contenido de CT2 en proporción 1:1. Ambos componentes se homogenizarán mediante la inversión suave de CT2. A

continuación, se emplearán columnas de separación por gradiente de densidad previamente preparadas. La preparación de estas columnas se llevará a cabo añadiendo 15mL de solución de Ficoll-Paque® (FisherCientific™) en un tubo de 50mL FGTcónico con filtro (núm. de catálogo 227290P, Greiner Bio-One™) que se centrifugará a 1.000 x g (21ºC) durante 1 minuto con rotor con freno (A-9, D-9). Tras la centrifugación la solución de Ficoll-Paque® habrá atravesado el filtro quedando preparada la columna. Este tubo se nombrará como FGT.

A continuación, se trasvasará el contenido de CT2 a FGT y este último se centrifugará a 1.000 x g (21ºC) durante 10 minutos con rotor con freno (A-9, D-9). El resultado obtenido será un sobrenadante claro por encima del filtro (serie leucocitaria junto con DPBS) y un precipitado rojo por debajo del filtro (serie eritrocitaria). La serie leucocitaria será transferida a un nuevo tubo cónico de 15mL (núm. catálogo 62.554.100, Sarstedt™) llamado CT3.

Para concluir el primer lavado, se centrifugará CT3 a 500 x g (21ºC) durante 10 minutos con rotor con freno (A-9, D-9). Este paso producirá una suspensión de doble capa con un sobrenadante de color claro DPBS y aproximadamente ≤1 ml de sedimento de PBMC de color rojo en la parte inferior del tubo. Se inspeccionará visualmente el tubo CT3 en busca de contaminación de glóbulos rojos. Si hay demasiados glóbulos rojos dentro del sedimento celular, se decantará el sobrenadante y se agregarán 10 ml de DPBS al tubo CT3 y se repetirá esta última centrifugación. El sobrenadante se descartará dejando únicamente en CT3 el sedimento de PBMCs.

El segundo lavado se realizará añadiendo 1mL de DPBS al precipitado de PBMCs de CT3 para resuspenderlas. A partir de esta dilución, se preparará en un tubo cónico de 1.5ml (núm. catálogo 62.554.100, Sarstedt™) una muestra de prueba para el recuentode células mezclando 0,001 ml (10 µl) de PBMC con 0,990 ml (990 µl) de DPBS para conseguir un volumen total de 1ml (1000 µl).

Para la tercera y última dilución se añadirá DPBS a CT3 hasta completar 5ml y se centrifugará a 250 x g (21ºC) durante 5 minutos con rotor con freno (A-9, D-9) con el fin de eliminar los posibles residuos restantes de células de la serie roja. Este paso producirá nuevamente una capa sobrenadante clara de DPBS y un precipitado de color blanquecino/rosáceo de PBMC en el fondo del tubo. Del mismo modo, el sobrenadante se descartará y el decantado de PBMC se resuspenderá en 100 µl de DPBS que se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

distribuirá en 2 crioviales de 1.6 ml con tapa azul (núm. de catálogo 72.380.006, Sarstedt^{TM}) a razón de 50 µl en cada uno (C1y C2).

Durante esta última centrifugación se preparará la cámara Neubauer para el recuento celular. Para ello se cargará en cada pocillo de la cámara 10µl de la muestra de prueba preparada previamente y se realizará el conteo celular. Del mismo modo que durante la extracción del plasma, se anotarán todos los datos recogidos en la plantilla 1.2 del Anexo 1 y se congelerán inmediatamente en nitrógeno líquido para su almacenaje.

Las muestras permanecerán almacenadas y serán utilizadas para la realización de análisis multiómicos únicamente si no hay disponibilidad de tejido sano.

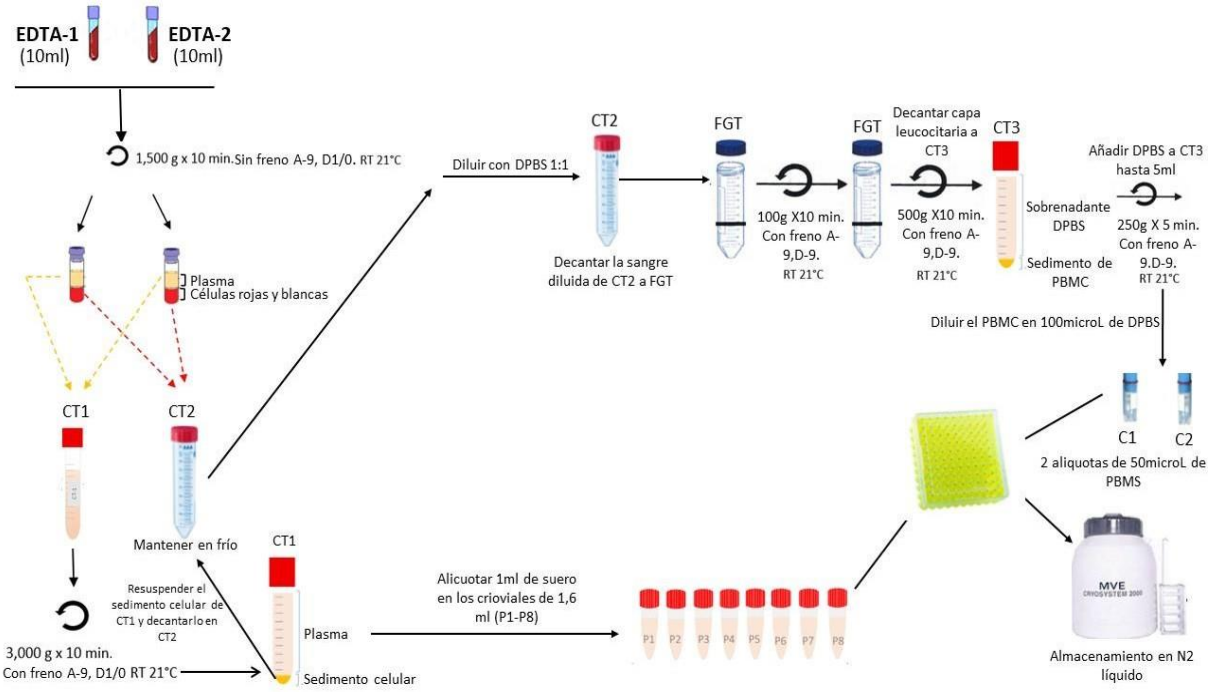


Figura 11. Protocolo de extracción de suero y PBMC a partir de sangre completa

5. Obtención y análisis de las muestras de tejido

Las muestras de tejido serán obtenidas a partir de la pieza extraída durante la cirugía. En primer lugar, se realizará una revisión de la localización del tumor y sus márgenes y se procederá a su marcaje. Así mismo, se identificará la disponibilidad de tejido sano del mismo órgano en el que se presenta el tumor.

Una vez localizadas las áreas de interés, se procederá con la disección de las mimas evitando las áreas necróticas, cauterizadas, fibróticas, grasas, así como las áreas de

tejido afectadas por soluciones fijadoras y/o colorantes de muestras. Dependiendo de la cantidad de tejido tumoral y de tejido sano disponible, las piezas diseccionadas se subdividirán atendiendo a lo dispuesto en la figura 12, siendo la mínima cantidad de tejido tumoral disponible por caso 150mg y el tamaño mínimo 5x5x5mm.

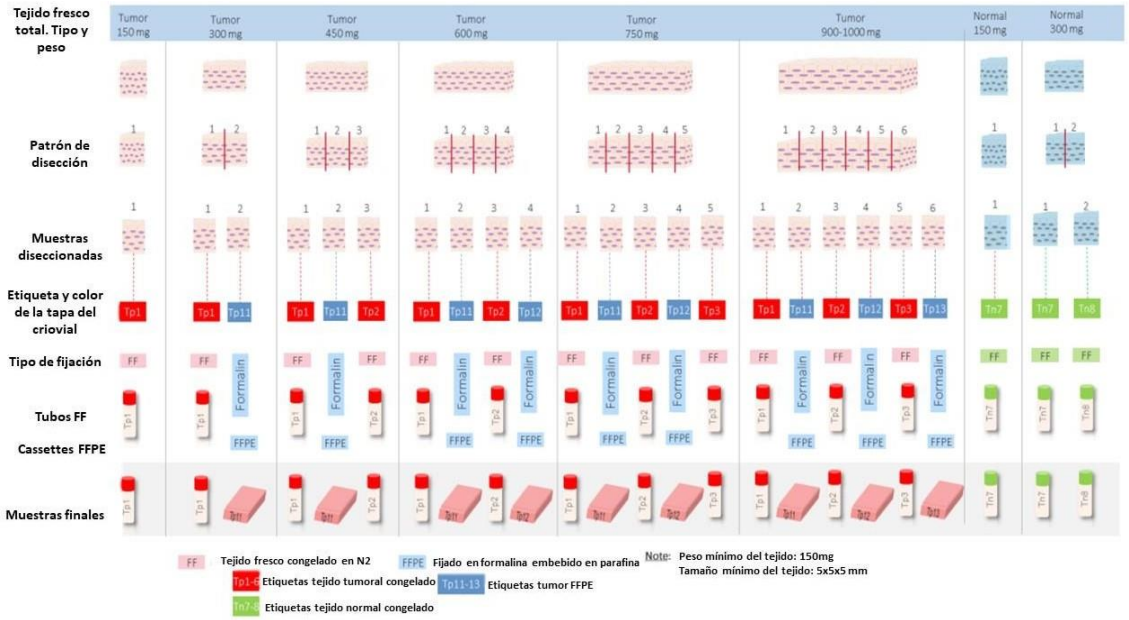


Figura 12. Patrón para la disección del tejido

Las muestras tumorales de tejido fresco serán depositadas por una parte en crioviales con tapón rojo de 1.6ml y rotuladas como Tp1,2,3…, y por otra en casetes (núm. de catálogo M492-3, Simport™) para la preparación de muestras en formalina rotulados como Tp11,12,13… Por su parte, las muestras de tejido sano fresco serán conservadas en crioviales de tapón verde de 1.6ml y nombradas como Tn7,8,9 etc.…

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Proceso estandarizado de realización de la muestra de tumor FFPE

Paso	Reactivo	Duración	Temp ºC	P/V	Agitador	Tiempo de goteo
1	Formalina	44	45	Ambiente	Intermedia	30
2	Etanol	30	45	Ambiente	Intermedia	30
3	Etanol	30	45	Ambiente	Intermedia	30
4	Etanol	30	45	Ambiente	Intermedia	30
5	Etanol	30	45	Ambiente	Intermedia	30
6	Etanol	60	45	Ambiente	Intermedia	30
7	Etanol	90	45	Ambiente	Intermedia	30
8	Xileno	45	45	Ambiente	Intermedia	30
9	Xileno	45	45	Ambiente	Intermedia	30
10	Xileno	45	45	Ambiente	Intermedia	30
11	Cera	60	65	Vacío	Intermedia	30
12	Cera	60	65	Vacío	Intermedia	30
13	Cera	80	65	Vacío	Intermedia	30
Tiempo total		11:15h				

El proceso de disección no debe sobrepasar los 10 minutos desde el momento en el que la pieza quirúrgica se encuentre *ex vivo* hasta que las muestras son introducidas en el nitrógeno líquido o en la formalina respectivamente para lograr la mínima degradación de sus componentes moleculares y así favorecer los análisis multiómicos que se llevarán a cabo posteriormente. Las muestras conservadas en formalina se almacenarán a temperatura ambiente y serán empleadas con fines de genotipado exclusivamente en caso de no haber tejido fresco suficiente disponible. Todo este proceso será fotografiadoy documentado de acuerdo con los datos recogidos en la plantilla 1.4 del Anexo 1.

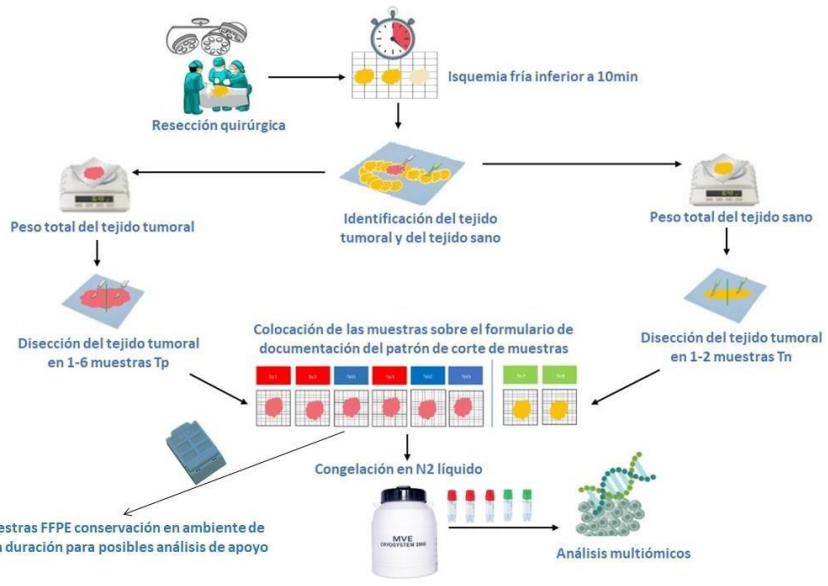


Figura 13. Protocolo de obtención de las muestras de tejido

Tras la obtención de las muestras de tejido, estas serán enviadas al laboratorio colaborador de Alemania y serán sometidas a un primer análisis de calidad con el fin de garantizar que el tejido es óptimo para realizar los análisis multiómicos. Estos criterios de calidad son los siguientes:

- Disección del tumor antes de que trascurran 10 minutos *ex vivo.*
- El tejido tumoral debe revelar al menos un 30% de células tumorales bajotinción de hematoxilina-eosina.
- Tanto la muestra de tumor como la de tejido sano no deben presentar necrosis en más de un 30% bajo tinción hematoxilina-eosina.

Aquellas muestras que pasen este primer control de calidad serán sometidas a los análisis multiómicos.

5.1. Purificación de DNA para Secuenciación de Genoma completo (WGS)

5.1.1. Mutaciones somáticas

El propósito de este análisis será generar un fichero VCF de las variaciones somáticas de Indels (inserciones o deleciones aleatorias de nucleótidos dentro de una secuencia de DNA) y SNVs (variaciones de un solo nucleótido en la secuencia de DNA) por caso. Para ello, se secuenciará el genoma completo de los pacientes a partir de las muestras en nitrógeno tanto de tejido fresco como de tejido normal.

En primer lugar, se extraerá el DNA genómico de las muestras emparejadas de tejido tumoral y tejido sano con el kit comercial QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) obteniendo un DNA purificado con valor A260/280=1.8-2.0. El DNA obtenido será entonces fraccionado con el sonicador Covaris E220 (Covaris, Inc., Massachusetts, EE.UU.) hasta conseguir fragmentos de entre 150-200 pares de bases. Seguidamente las librerías de secuenciación serán preparadas con el kit comercial Paired-end DNA sample preparation kit (Illumina, California, EE.UU.) mediante el cuallos extremos cizallados de los fragmentos de DNA obtenidos tras la sonicación serán reparados añadiéndose una base A en sentido 3’ y a continuación se ligarán a adaptadores de extremos emparejados de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los fragmentos ligados al adaptador se purificarán y enriquecerán por PCR siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la PCR se purificará en gel utilizando unKit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). La calidad de la librería será evaluada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

utilizando un analizador Agilent 2100 y chips DNA 1000 (Agilent Technology, California, EE.UU.). Una vez preparadas las librerías el DNA será secuenciado mediante el sistema Illumina®NovaSeq6000.

La secuenciación se llevará a cabo mediante la introducción de las librerías (lecturas emparejadas 2x100 pb) en las celdas de flujo del secuenciador para generar *clusters* de densidad siguiendo el protocolo estándar de Illumina utilizando el kit comercial NovaSeq Xp Workflow (Illumina, California, USA) con una profundidad de cobertura estimada de al menos 60X para el tejido tumoral y 30X para el tejido sano y una sensibilidad de la prueba del 99%. Todas las reacciones de secuenciación se realizan n tanto en dirección directa como inversa, y todas las mutaciones se confirmarán al menosdos veces por PCR independientes.

Una vez concluida la secuenciación del genoma completo del tejido sano y del tejido tumoral, los resultados de ambos serán alineados y comparados con el fin de eliminar del análisis las variaciones de la línea germinal.

Para el análisis de las variaciones somáticas, se prestará especial interés a los 109 genes especificados en la Tabla 11. La selección de estos genes se basa en los siguientes criterios: ser diana terapéutica, participar en las principales vías de señalización oncogénicas, tener una alta tasa de mutación y/o ser predictores de respuesta terapéutica. Estos fueron seleccionados si estaban presenten en alguna de los siguientes bases de datos del cáncer en diciembre de 2020: TruSight Oncology 500 Assay, FoundationOne CDx, OncoKB10, CiviC y DoCM12.

Tabla 11. Listado de genes seleccionado para NGS

Genes
41BB, ADORA2A, AKT, ALK, ANG1, ANG2, ANXA3, AR, B7H3, BRAF, BTK, CA125, CAIX, CCR4, CD105, CD109, CD24, CD27, CD40, CD70, CDK4, CDK6, CDK9, CKIT, COX2, CRAF, CSF1R, CTLA4, CXCR2, DLL3, DLL4, EGFR, EPHB4, ERBB3, FAK, FGF2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GITR, GPC3, HER2, HER3, HER4, HGF, HGFR, HIF1A, HSP27, HSP90, IDO1, IGF1R, IL6, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, LAG3, MEK1, MEK2, MET, MMP1, MMP10, MMP11, MMP13, MMP2, MMP7, MMP9, MTOR, MYC, NFKB, NKG2A, OX40, P53, PAF, PARP1, PARP2, PD1, PDGFRA, PDGFRB, PDL1, PDL2, PIK3CA, PIM1, PIM3, PSMA, RAF1, RET, SMO, SRC, STAT3, STEAP1, TGFB, TIE2, TIM3, TLR3, TLR8, TNF, TOR, TRAIL, TROP2, VEGF, VEGFA, VEGFC, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se establecerá, que las variables detectadas en el tejido eran SNVs o Indels de interés en función del cumplimiento de las siguientes condiciones: a) el número de lecturas

mapeadas de forma única en la posición debe ser dos o más; b) la calidad base promedio (puntuación phred Q) para el puesto debe ser 20; y c) la frecuencia de lectura de alelos en la posición debe ser de al menos el 20 %.

Para identificar los SNV e Indels potencialmente oncogénicos se establecieron las siguientes condiciones: a) SNV o Indels se localizan en el tejido tumoral dentro de una secuencia codificante y pueden modificar la cadena de aminoácidos (no sinónimos); b) el recuento de alelos con SNV debe ser cero en la secuencia objetivo de tejido normal; y c) las posiciones no deben ser polimorfismos según el dbSNP132 (*The Single Nucleotide Polymorphism database*). Las diferencias estadísticas entre el tejido tumoral y el tejido sano se calcularán usando el paquete de R limma.

Finalmente, para inferir la relevancia biológica y clínica de los resultados, el perfil obtenido de cada paciente se comparará con una cohorte de 100 pacientes con la misma enfermedad (cáncer de CRC o cáncer de pulmón) elegidos de manera aleatoria entre los 4500 pacientes que componen la cohorte total formada por los participantes de todos los hospitales incluidos en el proyecto TITANIA. De este modo, se pretende evitar el sesgo de mala clasificación, sesgo de selección o posibles sesgos o errores producidos por las diferentes técnicas de análisis. La distribución y características de la cohorte de adenocarcinoma de CRC y adenocarcinoma de pulmón se describe a continuación:

Tabla 12. Distribución de la cohorte control por paciente

Características de la cohorte control								
		Género		**Estadio**			**Tipo histológico**	
		F	**M**	**I**	**II**	**III**	**Adenocarcinoma**	**Otros**
CRC	**5C1**	72%	28%	20%	27%	53%	95%	5%
	5C2	42%	58%	12%	38%	54%	98%	2%
	5C4	47%	53%	15%	45%	46%	96%	4%
Pulmón	**5C7**	31%	43%	44%	24%	32%	50%	40%
	5C9	40%	60%	44%	25%	31%	58%	42%
	5C14	38%	62%	47%	27%	26%	51%	49%
	5C15	42%	58%	42%	26%	32%	61%	39%

Estos análisis se realizaron la colaboración con la Universidad de Rochester (Nueva York, EE.UU.)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.2 Mutaciones germinales en genes hereditarios

El análisis de mutaciones germinales en pacientes con adenocarcinoma de CRC y de pulmón, se llevará a cabo a partir de la muestra de tejido tumoral fresco y tejido normal fresco en todos los pacientes.

El DNA se extraerá con el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, para la extracción del DNA se emplearán 25mg de tejido tumoral previamente homogeneizado mediante el homogeneizador Bioprep-24 para posteriormente ser incubado en tampónde lisis a 56º. Seguidamente para conseguir una purificación óptima del DNA se empleará RNasa A para digerir las moléculas de RNA del DNA genómico. Por último,el gDNA será diluido y tratado con el kit comercial HS dsDNA (Life Technologies)para ser cuantificado con el Fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen™).

Los extractos de DNA serán cortados en fragmentos de 250 pares de bases y lasbibliotecas se construirán con el kit KAPA Hyper Prep (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, EE.UU.). A continuación, las bibliotecas indexadas se someterán a una hibridación basada en sondas con un panel de NGS personalizado dirigido a mutaciones germinales relevantes extraídas de la base de datos NCBI ClinVar (ver Tabla 13). Finalmente, las librerías serán secuenciadas utilizando un sistema Illumina NovaSeq 6000.

Las diferencias estadísticas entre el tejido tumoral y el tejido sano se calcularán usando el paquete de R limma.

Tabla 13. Panel de genes hereditarios seleccionados para NGS

Enfermedad	**Genes**
CRC	APC, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, PTEN, STK11, TP53
NSCLC	BRCA1, BRCA2, CHEK2, EGFR, HER2, TP53, YAP1

Estos análisis se realizaron la colaboración con la Universidad de Rochester (Nueva York, EE.UU.)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2. Purificación de RNA para transcriptómica

El propósito de este análisis será comparar los resultados obtenidos para cada muestra con la matriz de identificación de valores de expresión genómica recogidos en la base de datos Ensembl.

Para ello, el RNA total de las muestras congeladas en N2 se extraerá utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen™). Las muestras de RNA para las que se obtenga un valor de integridad de RNA (RIN) >7 (medido por bioanalizador) tanto en el tejido tumoral como en el tejido sano se emplearán para la construcción de las librerías de secuenciación.

Seguidamente, se empleará el kit comercia TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) para preparar la biblioteca de secuenciación a partir de RNA purificado, siguiendo las instrucciones del fabricante. A modo de resumen, se aislará el RNAm a partir de 1 μg de RNA total utilizando perlas magnéticas acopladas a oligo(dT). A continuación, el RNAm se fragmentará en piezas más pequeñas a alta temperatura. El DNAc de primera hebra se sintetizará utilizando transcriptasa inversa y cebadores aleatorios. Posteriormente, se generará el DNAc de doble hebra y se realizará la adenilación en los extremos 3' de los fragmentos de DNA. Los adaptadores serán ligados y posteriormente purificados utilizando el sistema AMPure XP (Beckman Coulter, Beverly, EE.UU.). La calidad de las bibliotecas se evaluará utilizando el sistema Agilent Bioanalyzer 2100 y un sistema de PCR en tiempo real.

Finalmente, las bibliotecas (lecturas emparejadas 1x150pb) serán secuenciadas mediante Illumina NovaSeq 6000 a una profundidad de cobertura de 60X para el tejido tumoral y 30X para el ido sano.

Las diferencias estadísticas entre el tejido tumoral y el tejido sano se calcularán usando el paquete de R limma. Estos análisis se realizaron la colaboración con la Universidad de Rochester (Nueva York, EE.UU.)

5.3. Purificación de proteínas para análisis proteómicos/fosfoproteómicos

El propósito de este análisis será comparar los resultados obtenidos para cada muestra con la matriz de identificación de valores de expresión de proteínas recogidos en la base de datos UNIPROT.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El análisis proteómico se llevará a cabo mediante la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF). Esta técnica es altamente compleja y su realización requiere de la intervención de expertos en el área, por lo que en este texto solamente se ofrecerá un breve resumen del procedimiento.

En primer lugar, las muestras de tejido fresco congelado serán seccionadas y montadas directamente en una placa MALDI recubierta de oro y fijadas por un proceso seriado de lavados con volúmenes crecientes de etanol, para continuar con el proceso de digestión con tripsina del tejido y la consiguiente obtención de los péptidos de las proteínas contenidas en el mismo.

A continuación, estos péptidos serán purificados mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore) y se les aplicará una solución de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico directamente a la placa MALDI para favorecer la ionización. Tras la cocristalización sobre la placa, las muestras son ionizadas por un rayo láser de nitrógeno provocando que los péptidos pierdan o ganen un protón. Este mecanismo de transferencia de protones a la fase gaseosa formará iones con la fórmula general $[M+H]^+$. Estos iones serán acelerados y el tiempo de vuelo hasta llegar al detector de velocidad será medido por el analizador de masas TOF.

El tiempo que tarda cada ion en llegar al detector crea una señal que indica la relación m/z en el eje x y la intensidad del ion en el eje y. Estos datos permiten establecer el tamaño y peso de la proteína y así poder compararla con la base de datos UNIPROT.

Para identificar los sitios de fosforilación de las proteínas se realizará el mismo proceso incluyendo un paso de enriquecimiento de la muestra de tejido con el kit de fosfopéptidos *High-Selected Fe-NTA y TiO_2* (Thermo Fisher^{TM}) tras el proceso de digestión.

Los datos del espectrómetro de masas obtenido se analizarán utilizando el software R-studio. Estos análisis se realizaron en colaboración con el *Institute of Molecular and Cell Biology* (IMCB) (Ciudad de Singapur, Singapur).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4. Análisis mutacionales analizados sobre el tejido en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

En el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, se llevan a cabo por práctica clínica habitual los siguientes análisis mutacionales en tumores en estadios tempranos (I-III) con el fin de ayudar al facultativo a escoger la mejor opción terapéutica dentro de las aprobadas en esta fase de la enfermedad: inestabilidad de microsatélites en los adenocarcinomas de CRC y estudio de mutaciones en EGFR, BRAF, KRAS, ALK, ROS1 y PD-L1 en los adenocarcinomas de pulmón.

Para determinar la presencia o ausencia de inestabilidad de microsatélites, se realiza estudio inmunohistoquímico de las siguientes proteínas de los genes reparadores de errores de replicación del DNA: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Por su parte, ladetección de la expresión de ALK y ROS1 también se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica.

La técnica de inmunohistoquímica se ejecuta de manera sistematizada en el equipo BenchMark Gx (Roche) mediante las técnicas VENTANA MMR RxDx, VENTANA ALK (D5F3) CDx y VENTANA ROS1 (SP384) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

A modo de resumen esta técnica se lleva a cabo a partir de tejido conservado en un bloque de parafina al que se le realizan cortes con microtomo de aproximadamente 5mm. A continuación, estos cortes son rehidratados y montados sobre un portaobjetos cargado positivamente (ayuda a la adherencia del corte al portaobjetos). Seguidamente, se procede con la desparafinización por calentamiento del portaobjetos y recuperación de epítopos mediante acondicionador celular (pH y tiempo de incubación dependiente del anticuerpo de elección). Seguidamente se aplica una solución de peróxido al 3% para a continuación aplicar al anticuerpo de interés unido al fluorocromo. El proceso continúa enjuagando el portaobjetos con *bluing reagent*, para posteriormente ser extraído del equipo y enjuagado con abundante agua corriente. En este punto delproceso se procede a deshidratar con alcoholes de concentraciones crecientes (75, 80, 90y 100 %) y a la aplicación posterior de un baño de xilol. Finalmente, las muestras son montadas con EUKITT para su observación al microscopio.

El control interno utilizado será tejido sano del paciente y en caso de no estar disponible se empleará un control externo con tejido colónico o pulmonar sano según proceda.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

La expresión nuclear de todas las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 será indicativo de que el sistema de reparación de errores del DNA es eficiente, mientras quela ausencia de expresión nuclear de alguna de ellas será indicador de un sistema de reparación deficiente. La detección de proteínas citoplasmáticas de fusión determinarála presencia de traslocación en *ALK* o *ROS1*. Todos los análisis presentan una sensibilidad superior al 85% y una especificidad superior al 90%.

La determinación de la expresión de PD-L1 también se realiza mediante inmunohistoquímica, aunque la técnica utilizada en este caso será ICH 28-8 pharmaDX y el equipo utilizado para realizar los análisis el Autostainer Link 48 (Dako-Agilent). Los procesos a los que será sometido el tejido (corte del tejido, incubación, desparafinización, rehidratación, marcaje y detección de epítopos, deshidratación ymontaje) son los mismos que en el caso de *ALK* y *ROS1* variando los reactivos y los tiempos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este caso el resultado será positivo si la cantidad de células tumorales positivas supera el 1%. Esta prueba presenta una sensibilidad >70% y una especificidad <90%.

Por otra parte, el estudio mutacional de *EGFR*, *NRAS* y *BRAF* se lleva cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real COBAS 4800 empleando los siguientes kits comerciales: EGFR cobas® v2 y BRAF/NRAS Mutation Test LSR ambos desarrollados por Roche. La prueba EGFR cobas® v2 es una prueba alelo-específica altamente sensible que emplea sondas de oligonucleótidos específicas para detectar los 42 tipos de mutaciones más frecuentes que ocurren en *EGFR*. Las mutaciones cubiertas consisten en 29 deleciones en el exón 19, cinco inserciones en el exón 20, tres mutaciones sin sentido G719X, dos mutaciones sin sentido L858R y mutaciones sin sentido en S768I, T790M yL861Q.

El proceso de análisis se lleva a cabo principalmente mediante dos procesos: la extracción de DNA de muestras de tejido y la amplificación por PCR. El DNA se extraede muestras fijadas en formalina y conservadas en parafina. Posteriormente, el DNA genómico extraído de estas muestras se somete a análisis con un analizador cobas 4800. Durante el proceso de amplificación, los cebadores específicos de alelo se dirigenespecíficamente a las secuencias de mutación determinando si la muestra presentaalguna de las mutaciones diana que cubre este kit. Los reactivos, pasos y tiempos de procesado se llevan a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el caso de *BRAF* y *NRAS* la amplificación y análisis del DNA objetivo se lleva a cabo utilizando los reactivos suministrados en el kit comercial BRAF/NRAS Mutation Test LSR (Roche). Este kit es capaz de detectar 11 mutaciones puntuales en los exones 11 y 15 del gen *BRAF*, así como 25 mutaciones en los exones 2, 3 y 4 del gen *NRAS*.Por otro lado, este kit es capaz de detectar 28 mutaciones en los exones 2, 3 y 4 del gen *KRAS*. Estos análisis mutacionales se llevan a cabo siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante del kit. Los controles internos positivo y negativo vienen incluidos en los kits comerciales.

Las limitaciones de este tipo de método analítico son las siguientes: sensibilidad del método del 5%, no detección del espectro completo de mutaciones del gen, no especificación del tipo de Indel, no aportación de la frecuencia alélica.

En el caso de requerirse un análisis mutacional más extenso la técnica de elección del centro es la secuenciación masiva dirigida (NGS) a un panel de 49 genes y tipos de variantes que puede verse en la tabla 14.

Tabla 14. Genes y tipos de cariantes incluidas en el panel de NGS empleado en el CHUS para adenocarcinoma de pulmón

Genes y tipos de variantes incluidas en el panel
Mutaciones puntuales e Indels: AKT1,AKT3,ALK,APC,BRAF,BRACA1,BRACA2,CDKN2A,CKIT, CTNNB1,DDR2,EGFR,FGFR1,FGFR2,FGFR3,HER2,HER3,HER4,HRAS,IDH1,IDH2,JAK1,JAK2,KEAP1,KRAS, LKB1,MAP2K1,MAP2K2,MET,MTOR,MYC,NF1,NRAS,NRG1,NTRK1,NTRK2,NTRK3,PDGFRA,PI3KCA,POL D1,POLE,PTEN,RB1,RET,ROS1,SLC24A2,SOX2,TERT,TP53.
Reordenamientos: ALK, BRAF, EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3,NRG1,NTRK1,NTRK2,NTRK3,RET,ROS1
Ganancia de número de copias (CNVs): AKT1, AKT3, ALK, APC, BRAF,BRACA1,BRACA2,CDKN2A,CKIT, CTNNB1,DDR2,EGFR,FGFR1,FGFR2,FGFR3,HER2,HER3,HER4,HRAS,IDH1,IDH2,JAK1,JAK2,KEAP1,KRAS, LKB1,MAP2K1,MAP2K2,MET,MTOR,MYC,NF1,NRAS,NRG1,NTRK1,NTRK2,NTRK3,PDGFRA,PI3KCA,POL D1,POLE,PTEN,RB1,RET,ROS1,SLC24A2,SOX2,TERT,TP53.

Para ello, en primer lugar, se extraerá el DNA genómico de las muestras emparejadas de tejido tumoral y tejido sano con el kit comercial QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) obteniéndose un DNA purificado con valor por espectrometría de A260/280=1.8-2.0. El DNA obtenido será fraccionado con el sonicador enzimático Covaris S220 (Covaris, Inc., Massachusetts, USA). Seguidamente, las librerías serán preparadas con el kit comercial SureSelectXT HS Target Enrichement System for Illumina Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies). La calidad de la librería se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

evaluará utilizando un analizador Agilent 4200. Una vez preparadas las librerías el DNA será secuenciado mediante el sistema Illumina®NextSeq 500/550. La profundidad de cobertura estimada de la prueba es de 300-500X y la sensibilidad de la técnica del 99%.

El análisis de variantes se realizará mediante los softwares SureCell y Alissa (Agilent Technologies), basándose en los registros disponibles en las bases de datos CViC(versión 16), ClinVar (versión 21), OMIM (2021-01-06), CGDS_GENE (versión 2), ClinGene, CGDS (versión 2), COSMIC (versión 18), DECIPHER síndromes 2020-05- 23, DGV (versión 2), VariantFunction (versión 35), Transcript based Variantannotation.dbSNP (versión 6), dbSNP build 151.ESP6500 (versión 3), Database offunctional predictions for non-synonymous SNPs, 1000Genomes (versión 1) 1000 Genomes Phase 1 release v3.20101123, 1000 Genomes Phase 3 (versión 2)1000 Genomes Phase 3 release v5 (10 september 2014) incuding GRCh38 data, ExAC (versión 3) ExAC reléase 1.0 including GRCh38 from liftover data gnomaD (versión 3)gnomaD reléase 2.0.2 with additional multi-allelic insertations and GRCh38 statistics.

Por su parte, el análisis de CNVs se realizará mediante el software CNVkit ("*Genome-wide copy number from high throughput sequencing"*), BRCA Exchange.

Cabe destacar que este análisis de secuenciación masiva puede identificar tanto variantes genómicas somáticas como germinales, pero no permite diferenciar entreambas.

6. Establecimiento de un circuito de trabajo en el hospital para la obtención y análisis de las muestras de sangre, muestras de tejido y datos clínicos de lospacientes

El desarrollo de este proyecto requiere una colaboración eficaz y eficiente entre los diferentes servicios implicados. Con el fin de garantizar los estándares de calidaddescritos en los apartados anteriores para la recolección de las muestras y lograr la unificación de procedimientos independientemente del servicio a través del cual el paciente haya sido identificado se plantea el siguiente circuito de actuación:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fase prequirúrgica:

1. Revisión de las listas quirúrgicas de los servicios de cirugía digestiva y cirugía torácica para la identificación de candidatos potenciales por parte del equipo de EECC de oncología.
2. Selección de candidatos
3. Envío de la selección preliminar de candidatos al cirujano y al patólogo colaboradores para segunda revisión y selección final de candidatos elegibles.
4. Ofrecimiento de la hoja de invitación a participar en el estudio (Anexo 2)diseñada por el servicio de ensayos clínicos de oncología en la primera consulta prequirúrgica con el servicio de cirugía digestiva o cirugía torácica y consiguiente derivación al servicio de oncología médica.
5. Proceso de información y consentimiento informado por parte del servicio de oncología médica.
6. Recogida de datos clínicos basales (plantilla 1.1 Anexo 1) del paciente a través de entrevista personal con el mismo y revisión de la historia clínica.
7. Envío del listado de pacientes que han otorgado su consentimiento para participar en el estudio al servicio de anatomía patológica.
8. Revisión de la fecha definitiva de cirugía de los pacientes reclutados. Preparación del material necesario para el día de la cirugía (extracción y procesamiento de sangre y tejido, así como las plantillas de recogida de datos)

Fase quirúrgica:

9. El personal de EECC de oncología acudirá a quirófano y extraerá las muestras de sangre periférica antes de que el paciente sea anestesiado. Se comienza el proceso de toma de los datos intraoperatorios (plantilla 1.3 Anexo 1) en colaboración con el cirujano y se lleva a cabo el protocolo de extracción de suero sanguíneo y PBMCs descrito en el apartado 4.
10. El equipo de EECC de oncología es avisado aproximadamente media hora antes del fin de la resección desde quirófano.
11. El equipo de EECC da aviso al servicio de anatomía patológica y juntos preparan el material necesario para el tallado y la congelación en nitrógeno del tumor (proceso detallado descrito en el apartado 5).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

12. El equipo de EECC acudirá de nuevo a quirófano en los minutos previos al finde la resección para recoger y trasladar el tumor hasta el servicio de anatomía patológica. También se recogerá la plantilla con los datos intraoperatorios.
13. Una vez en el servicio de anatomía patológica el equipo de EECC junto con el patólogo llevarán a cabo el proceso de obtención de las muestras tumorales tal y como se ha descrito en el apartado 5 de este capítulo.

Fase postquirúrgica:

14. Se recogerán los datos relativos al ingreso, así como el informe final emitido por anatomía patológica.
15. Se seguirá el cronograma de visitas de esta fase descrito en el apartado 1. En cada visita se extraerá sangre periférica para la obtención de suero sanguíneo y PBMCs siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4 y se recogerán los datos pertinentes (plantilla 1.2 Anexo 1)

El esquema detallado que se utilizó durante el desarrollo de este estudio y que fue distribuido a los colaboradores puede consultarse en el Anexo 3.

7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizará en todos los pacientes válidos. Un paciente será válido para el análisis si se verifica el cumplimiento de los criterios de elegibilidad y los datos necesarios para el análisis están disponibles.

La diferencia estadística entre el tejido tumoral y el tejido normal adyacente se calculará utilizando el paquete Limma del software estadístico R versión 3.2 para datos obtenidos de los análisis genómicos y transcriptómicos. En el caso de los datos obtenidos del análisis proteómico, estos serán analizados en el software estadístico R versión 3.2 mediante el paquete MAILDIquant aplicando la prueba estadística *Wilcox Rank sum test*y corregido para múltiples pruebas usando la tasa de descubrimientos falsos (FDR). Los puntos de corte para categorizar el valor de significancia de los niveles de expresión de las diferentes biomoléculas se establecerán de acuerdo con el percentil que mejor agrupeel perfil de los pacientes incluidos en la cohorte general de 4500 pacientes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para determinar la supervivencia libre de progresión, así como la supervivencia global se empleará la prueba estadística *Kaplan-Maier* cuyas diferencias serán analizadas por la prueba de rango logarítmico mediante el programa GraphPad Prism 6.

8. Aspectos éticos y legales

Este proyecto emplea muestras de tejido y sangre humanas de pacientes con adenocarcinoma de pulmón o colorrectal y compila datos clínicos personales de los mismos. Por este motivo, el proyecto se desarrollará bajo las pautas establecidas en ICH Código de Buenas Prácticas Clínicas, la Directiva 2001/20/EC y el Reglamento (UE) 2016/679. El manejo de muestras biológicas se adscribirá a lo establecido en la legislación española en la Ley 14/2007 (3 de julio), el RD 1301/2006 (10 de noviembre)y el RD 1716/2011 (18 de noviembre).

Igualmente, su desarrollo se adherirá a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki y posteriores enmiendas y La Convención sobre Derechos Humanos y Biomedicina del Consejo Europeo y sus Protocolos adicionales.

Por todo lo anteriormente nombrado, para su inclusión en el estudio, los pacientes firmarán un consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio. El modelo de consentimiento informado y la aprobación del estudio por parte del Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia (CEICG) se muestra en los Anexos 4 y 5.

En esta tesis se presentan un total de 42 figuras y 28 tablas cuya elaboración, a excepción de la Figura 1 y las Tablas 1 y 2, ha sido realizada exclusivamente por la autora de este trabajo. En el caso de la Figura 1 y las Tablas 1 y 2 estas han sido obtenidas de artículos de acceso abierto distribuidos bajo los términos de la licencia *"Creative Commons CC-BY"* que permite el uso, la distribución y la reproducción de su contenido en cualquier medio siempre y cuando el trabajo original esté adecuadamente citado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resultados

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 4: Resultados

Entre septiembre del 2020 y marzo del 2021, 14 pacientes fueron seleccionados e incluidos en el estudio a través de los servicios de neumología, digestivo y oncología del Hospital Clínicos Universitario de Santiago de Compostela.

A estos pacientes se les otorgó un número de inclusión comprendido entre 5C1 y 5C15 de manera correlativa atendiendo estrictamente al orden de inclusión. Por error, el número 5C10 no se otorgó a ningún paciente. En todos ellos se completó tanto la fase prequirúrgica como la fase quirúrgica del estudio, obteniéndose muestras de sangre, muestras de tumor y tejido sano, así como los datos clínicos basales.

De estas 14 muestras, el 50% (5C3, 5C5, 5C6, 6C8,5C115C12 y 5C13) no pasaron el primer control de calidad (% células tumorales > 30%, % de necrosis < 30%) imprescindible para poder realizarse los análisis multiómicos por lo que estos participantes fueron considerados fallos de selección y sobre sus muestras no se realizaron más análisis ni continuaron en la fase postquirúrgica.

Sobre las muestras obtenidas de los 7 pacientes restantes (5C1, 5C2, 5C4, 5C7, 5C9, 5C14 y 5C15), se realizaron los análisis multiómicos descritos en el apartado 5 del capítulo de material y métodos y se completó la fase postquirúrgica del proyecto.

En este apartado, se muestran los resultados obtenidos en aquellos pacientes que completaron todas las fases del proyecto y cuyas muestras tuvieron calidad suficiente para poder ser sometidas a los análisis multiómicos4.1. Datos clínicos: fase prequirúrgica y postquirúrgica

Los datos demográficos y clínicos basales están descritos en la Tabla 15 para los pacientes con adenocarcinoma de CRC y en la Tabla 16 para los pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

Los pacientes incluidos con diagnóstico de adenocarcinoma de CRC fueron 3; una mujer y dos hombres con edades comprendidas entre los 57 y los 75 años.

Entre los hábitos modificables, destaca la alta ingesta de carne semanal, declarando todos ellos un consumo diario de este alimento, superando por tanto entre 2 y 3 veces la recomendación de la WHO de no ingerir más de 2/4 piezas a la semana. Así mismo destaca el estilo de vida sedentario de estos pacientes y especialmente en el caso de los hombres el histórico de consumo abusivo tanto de tabaco como de alcohol.

Tabla 15. Datos clínicos relativos a la fase prequirúrgica de los pacientes con adenocarcinoma de CRC

Fase prequirúrgica - Datos basales			
Variable/Paciente	**5C1**	**5C2**	**5C4**
Fecha obtención CI	14-Oct-2020	14-Oct-2020	20-Nov-2020
Año de nacimiento	1945	1945	1963
Sexo	Femenino	Masculino	Masculino
Población	Caucásico	Caucásico	Caucásico
PS	1	1	0
BMI	20,1	28,7	27,0
Estabilidad de BMI	Si	Si	No
Vegetariano	No	No	No
Ingesta de carne (DxS)*	7	7	7
Ingesta verdura/fruta (DxS)*	7	7	7
Actividad física (veces/semana)	3 x Andar	No	No
Uso de sustancias	No	Exfumador de cigarrillos (2014) IPA108 y bebedor de 8 UBE/día	Exfumador hace más de 30 años (no sabe especificar consumo exacto) y bebedor de 1 UBE/día
Fumador secundario	Si (pareja y amistades)	No	No
Exposición a tóxicos	No	No	No
Medicación concomitante**	No	-Metformina (19-Dic-2012) -Nitroplast (25-Sep-2019) -Pantoprazol (11-Feb-2014) -Zyloric (3-abr-2019) -Adiro (11-Feb-2014) -Kentera (1-Jul-2020) -Ranexa (8-May-2014) -Enoxaparina (23-Sep-2020) -Metoprolol (30-Jul-2018) -Paracetamol (29-Dic-2020) -Cafnitrina (24-Ene-2019) -Colchicina (29-Dic-2020) -Atorvastatina (25-Sep-2019)	-Hidroclorotiazida (22-May-2012) -Metformina (11-Oct-2019) -Tamsulosina (12-Nov-2019) -Simvastatina (15-Nov-2019)
Alergias medicamentosas	No	No	No
Enfermedades previas	No	-Hipertensión arterial (Nov-20) -Hiperplasia benigna de próstata (Jun-17) -Diabetes Mellitus tipo 2 (Nov-20) -Insomnio (Jun-13) -Dislipemia (Nov-20) -Hiperuricemia (Ene-16 -Arterosclerosis (Nov-23)	-Hipertensión arterial (Ago-19) -Diabetes Mellitus tipo 2 (Sep-19) -Dislipemia (Nov-19)
Cirugías previas	No	-Herniorrafía umbilical (Jul-10) -Prostatectomía (Jun-17) -Facoemulsificación (Ene-13)	No
Historia oncológica	No	No	No
Participación en cribados contra el cáncer	No	No	No
Historia familiar oncológica	No	No	No
Diagnóstico actual oncológico	Adenocarcinoma rectosigmoideo	Adenocarcinoma de sigma	Adenocarcinoma de sigma
Fecha del diagnóstico actual	Sep-2020	Ago-2020	Nov 2020
Método diagnóstico	Colonoscopia	Colonoscopia	Colonoscopia
Presentación del tumor	Primario	Primario	Primario
TNM (8 edición AJCC)	TXNXMX	TXNXMX	TXNXMX
Grado	Bien diferenciado (G1)	Bien diferenciado (G1)	Bien diferenciado (G1)
Localización	Colon sigmoide (20 cm por encima del ano)	Colon sigmoide (25 cm por encima del ano)	Colon sigmoide (22 cm por encima del ano)
Grupo sanguíneo	0+	0+	0+
Hematología***	MCH:31.8 pg, [27.0 - 31.0]	-Eritrocitos: 3.61 x10^6 /µl [4.5 - 5.5] -Hematocrito: 34.5% [41.0 - 53.3] -Hemoglobina: 11g/dl [13.5 - 17.5]	-Hematocrito:38.5% 41.0 - 53.3] -Hemoglobina:12.2 g/dl [13.5 - 17.5] -Leucocitos: 2.97x10^3/ µl [4.09 - 10.8] -MCH: 23.7 pg, [27.0 - 31.0]
Bioquímica***	En rango	En rango	En rango
Serología***	Negativa	Negativa	Negativa
Marcadores tumorales	CEA: 39.4 ng/dl [0.0 - 2.5]	CEA: 0.9 ng/dl [0.0 - 2.5]	CEA: 7.1 ng/dl [0.0 - 2.5]
Signos/Síntomas	-Heces alquitranadas -Hemafecia -Distensión abdominal	No, neoplasia descubierta por prueba diagnóstica para otra patología	-Pérdida de peso -Anemia -Distensión abdominal con flatulencias -Hemafecia

*Días por semana; ** (Fecha de inicio) ***Solamente se muestran los resultados que se encuentran fuera de rango

Con respecto a los antecedentes clínicos los pacientes 5C2 y 5C4 presentan 2 o más enfermedades crónicas relacionadas con los sistemas metabólico y cardiovascular siendo por ello el paciente 5C2 por definición (+6 fármacos + de 6 meses) un paciente polimedicado.

En lo relativo a los datos obtenidos sobre la historia oncológica, ninguno de los participantes refirió tener ni haber tenido historia propia o familiar relevante por lo que no participaban activamente ni habían participado con anterioridad en los cribados autonómicos contra el cáncer de colon pese a que en el momento del diagnóstico por edad (indicado en personas entre 50 y 69 años) el paciente 5C4 era candidato.

Si hablamos específicamente del diagnóstico actual, todos los participantes fueron diagnosticados mediante colonoscopia y biopsia de adenocarcinoma localizado en el sigma a una distancia de entre 20 y 25 cm por encima del ano. Las características patológicas de los tumores también fueron similares, presentando todos ellos una alta diferenciación celular (G1) y un TNM no reportable.

En cuanto a los valores analíticos, podemos observar una muy leve anemia en los pacientes 5C2 y 5C4 atribuible a hemafecia. Por otra parte, los valores irregulares en el panel de bioquímica no representan cifras clínicamente significativas, siendo el único parámetro que presentó valores fuera de rango clínicamente significativos el CEA que arrojo un valor 16 y 3 veces superior al límite superior normal en los pacientes 5C1 y 5C4 respectivamente.

Finalmente, los resultados de la anamnesis de signos y síntomas ponen de manifiesto como primeros signos o síntomas de enfermedad percibidos por los pacientes las molestias digestivas tales como heces alquitranadas, hemafecia, distensión abdominal, o flatulencias en el caso de los pacientes 5C1 y 5C4. En este último además se detectó un descenso en el peso corporal de aproximadamente 16 kg. Por su parte, el paciente 5C2 no manifestó haber detectado ningún signo ni síntoma relacionado con el cáncer.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 16. Datos clínicos relativos a la fase prequirúrgica de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón

Fase prequirúrgica - Datos basales				
Variable/Paciente	**5C7**	**5C9**	**5C14**	**5C15**
Fecha obtención CI	10-Feb-2021	01-Feb-2021	12-Mar-2021	5-Mar-2021
Año de nacimiento	1948	1938	1952	1977
Sexo	Masculino	Masculino	Femenino	Masculino
Población	Caucásico	Caucásico	Caucásico	Caucásico
PS	1	1	1	0
BMI	33,2	27,1	23,6	26,6
Estabilidad de BMI	Si	Si	Si	Si
Vegetariano	No	No	No	No
Ingesta de carne (DxS)*	7	7	7	7
Ingesta verdura/fruta (DxS)*	7	7	7	7
Actividad física (veces/semana)	No	No	3 x Andar	2 x Andar
Uso de sustancias	Exfumador de cigarrillos desde 1991 IPA 40	Exfumador de cigarrillos desde 2014 IPA 66	Exfumadora de cigarrillos desde 2018 IPA 70	No
Fumador secundario	No	No	No	No
Exposición a tóxicos	No	No	No	No
Medicación concomitante **	-Ibesartán (23-Mar-2018) -Simvastatina (17-Feb-2016)	-Omeprazol (14-Nov-2011 -Betmiga (23-Dic-2014) -Carduran (5-Abr-2019) -Pravastatina (27-Ene-2011)	-Enalapril (18-Ago-2008) -Hidroaltesona (11-Ene-2009) -Amlodipino (11-Ene-2011) -Hidroferol (9-Mar-2017) -Eutirox (20-Sep-2019) -Omeprazol (20-Sep-2019) -Carbocal (29-Nov-2019)	-Levotiroxina (11-Ene-2019)
Alergias Medicamentosas	Pirazolonas y derivados	No	No	No
Enfermedades previas	-Hipertensión arterial (May-2018) -Hipercolesterolemia (Feb-2016) -Hipoacusia (Jun-2013) -Hiperplasia benigna de próstata (2007)	No	-Hipertensión arterial (Ene-2009) -Hipercolesterolemia (Ene-2011) -Gastritis (Ene-2019) -Osteoporosis (Nov-2019) -Panhipopituitarismo (Nov-2009)	-Hipotiroidismo (Ene-2019) -Parálisis cerebral coreoatetósica (desde infancia)
Cirugías previas	Prostatectomía (2007)	Resección gástrica por GIST (Mar-2011)	Resección tumoral intraoral por carcinoma del suelo de la boca 19-Oct-2017)	No
Historia oncológica	No	Adenocarcinoma de próstata Gleason 6 (Ene-2011) en remisión completa	Neoplasia maligna del suelo de la boca (T1N0M0, bajo grado). Diagnostico Oct-2017, en remisión completa	No
Participación en cribados contra el cáncer	No	No	No	No
Historia familiar oncológica	Hermano ca ORL (fumador)	No	-Hermana 1: cáncer de mama. Viva -Hermana 2: cáncer de pulmón. Viva -Madre: cáncer de ovario. Fallecida -Padre: cáncer de próstata. Fallecido	No
Diagnóstico actual	Adenocarcinoma patrón acinar	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma patrón acinar	Adenocarcinoma patrón acinar
Método diagnóstico	CT	CT de seguimiento del adenocarcinoma de próstata	CT de seguimiento del carcinoma de suelo de la boca	CT
Fecha del diagnóstico actual oncológico	Mar-2021	Dec-2020	Ene-2021	Feb-2021
Presentación del tumor	Primario	Primario	Primario	Primario
TNM	pT4pN0M0 (IIIA)	pT2apN2M0 (IIIA)	pT1cpN0M0 (IA)	pT1cpN0M0 (IA)
Grado	Bien diferenciado (G1)	Moderadamente diferenciado (G2)	Bien diferenciado (G1)	Bien diferenciado (G1)
Localización	Lóbulo inferior derecho	Lóbulo inferior derecho	Lóbulo inferior derecho	Lóbulo inferior izquierdo
Tamaño	86 mm	23 mm	28 mm	35 mm
Grupo sanguíneo	A+	0+	0+	0+
Hematología***	-Leucocitos :13.85 x10^3/µl [4.09 - 10.8]	En rango	-Eritrocitos: 3.16 x10^6 /µl [4.5 - 5.5] -Hematocrito: 32.0 % [41.0 - 53.3] -Hemoglobina: 10 g/dl [13.5 - 17.5]	En rangosgarrub
Bioquímica***	Glucosa: 230 mg/dl [4.0 - 106.0]	En rango	Glucosa: 176 mg/dl [74.0 - 106.0]	En rango
Serología***	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Marcadores tumorales	No analizado	No analizado	No analizado	No analizado
Signos/Síntomas	-Tos -Disnea	-Disgeusia -Disnea de moderados esfuerzos	-Asintomática	-Asintomático

*Días por semana; ** (Fecha de inicio) **Solamente se muestran los resultados que se encuentran fuera de rango

Por su parte, los pacientes incluidos con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón fueron 4, 1 mujer y 3 hombres con edades comprendidas entre los 44 y los 83.

En esta ocasión, vemos repeticiones en los patrones de conducta modificables, presentando igualmente este grupo una ingesta elevada de carne a la semana, así como una actividad física ligera. Así mismo 3 de los 4 participantes eran fumadores severos, aunque cabe destacar que no se reportaron datos de consumo abusivo de alcohol u otros tóxicos.

Si reparamos en los antecedentes clínicos no oncológicos, el paciente 5C9 no presentaba ninguna enfermedad crónica concomitante, mientras que los pacientes 5C7 y 5C14 presentaban enfermedades vasculares como la hipertensión o metabólicas como la hipercolesterolemia. Diferencialmente respecto al grupo de CRC los pacientes 5C14 y 5C15 presentaron enfermedades crónicas del eje hipofisario (panhipopituitarismo e hipotiroidismo).

En cuanto a los datos obtenidos sobre la historia oncológica, el paciente 5C9 padeció en 2011 un adenocarcinoma de próstata (Gleason 6) para el que fue tratado exclusivamente con radioterapia radical obteniéndose respuesta completa que mantiene hasta la actualidad. Por su parte, la paciente 5C14 también presentó antecedentes oncológicos en este caso un carcinoma del suelo de la boca (T1N0M0, grado 1) diagnosticado en 2017 y tratado con cirugía radical sin evidencia de recidiva.

Los pacientes 5C9 y 5C15 no tenían antecedentes familiares, mientras que el paciente 5C9 hizo referencia a un hermano vivo con cáncer de cabeza y cuello (no disponemos de datos sobre la localización exacta o histología del tumor) y la paciente 5C14 a dos hermanas vivas con cáncer de mama y pulmón respectivamente, así como a ambos progenitores fallecidos a causa de cáncer de ovario y próstata

En lo que atañe al diagnóstico actual, todos los pacientes fueron diagnosticados por CT y posterior biopsia de adenocarcinoma de pulmón localizado en el lóbulo inferiorderecho en los pacientes 5C7, 5C9 y 5C14 y lóbulo inferior izquierdo en el paciente 5C15 con un tamaño comprendido entre los 22mm y los 86mm. Los pacientes 5C7, 5C14 y 5C15 presentaron un patrón histológico predominante acinar mientras que en el paciente 5C9 no se pudo determinar ningún patrón específico. El paciente 5C9 presentó un G2, el resto G1.

USC UNIDADE DE COMPOSTELA

Observando los valores analíticos, destaca únicamente que el paciente 5C14 presenta anemia grado 1 (hemoglobina 10-13g/dl). No obstante, pese a que el resto de los valores fuera de rango de los otros pacientes no representan valores clínicamente significativos, cabe destacar que en ninguno de los pacientes se ha realizado por práctica habitual la medición de marcadores tumorales. También, destaca que 3 de los 4 participantes presentan el grupo sanguíneo 0+.

Por último, en lo que respecta a los signos y síntomas, los pacientes 5C7 y 5C9reportaron episodios de tos, disgeusia y disnea respectivamente, mientras que los pacientes 5C14 y 5C15 no reportaron ningún síntoma.

Tabla 17. Datos clínicos relativos al seguimiento post-cirugía dentro de la fase postquirúrgica

Fase postquirúrgica – Datos post-cirugía							
Variable/Paciente	**5C1**	**5C2**	**5C4**	**5C7**	**5C9**	**5C14**	**5C15**
Fecha de alta	20-Oct-2020	29-Oct-2020	9-Dic-2020	15-Mar-2021	9-Abr-2021	14-Abr-2021	28-Abr-21
Estatus de supervivencia al alta	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo
Eventos adversos durante el ingreso	No	Episodio de opresión torácica	No	Episodio de desaturación y fiebre	No	No	No
Diagnóstico histológico	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma tipo acinar	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma acinar	Adenocarcinoma acinar
TNM	pT3pN0M0	pT2pN0M0	pT3pN1b	pT4pN0M0	pT2apN2M0	pT1cpN0M0	pT1cpN0M0
Invasión linfática	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1
Invasión vascular	V0	V0	V0	V0	V1	V0	V1
Radicalidad local	R0	R0	R0	R0	R0	R0	R0
Radicalidad total	R0	R0	R0	R0	R0	R0	R0
Grado	G1	G1	G1	G1	G2	G2	G1
Estadio	IIA	I	IIIB	IIIA	IIIA	IA	IA
Estatus mutacional	No realizado	pMMR/MSS	pMMR/MSS	Ausente para EGFR, BRAF, KRAS, PD-L1, ALK y ROS1	PD-L1 95% STK11 c.580G >A P53 mutado	PD-L1 20% KRAS G12C	pMMR/MSS
Obtención muestras de sangre	Sí (10-Nov-2020)	Si (11-Nov-2020)	Si (31-Dic-2020)	Si (16-Mar-2021)	Si, (5-Abr-2021)	Si (6-May-2021)	Si (24-May-21)
Incidencias	No	No	No	No	No	No	No

Pasando al periodo post-cirugía los datos obtenidos en la primera visita de seguimiento en las 3-4semanas aproximadamente tras la cirugía y que se compilan en la Tabla 17 reflejan una supervivencia del 100% de los participantes con una media de días de

ingreso de 9 en el caso de los adenocarcinomas de CRC y de 17 en el caso de los adenocarcinomas de pulmón y una media total de 14 días.

Los eventos adversos de relevancia reportados durante el ingreso postcirugía fueron 2, un infarto agudo de miocardio sin elevación de ST en el paciente 5C2 y un episodio de desaturación con fiebre en el caso del paciente 5C7. El primero de los episodios se relacionó con patología cardiaca previa y cedió con la administración de cafinitrina (vasodilatador) no relacionado con la cirugía ni el adenocarcinoma de CRC. Por su parte, el segundo de los episodios cedió con oxigenoterapia y antibioterapia, aunque derivó en una prolongación de la hospitalización hasta los 36 días postcirugía.

En lo referente a los análisis patológicos locales, el diagnóstico de adenocarcinoma se confirmó en todos los participantes, así como el subtipo acinar en los pacientes 5C7, 5C14 y 5C15. Los pacientes con adenocarcinoma de CRC presentaron tumores con estadios comprendidos entre el I y el IIIB mientras que los pacientes con adenocarcinoma de pulmón lo hicieron con estadios comprendidos entre IA y IIIA, pudiéndose descartar definitivamente en todos ellos enfermedad a distancia.

Siguiendo los resultados del análisis patológico de las piezas quirúrgicas se evidenció leve invasión linfovascular en los pacientes 5C1, 5C4, 5C9 y 5C15 lo que indicaría que el tumor no invade la luz del vaso infiltrado. También se notificó la no afectación de los márgenes quirúrgicos y la baja desdiferenciación de las células del tumor en todos los casos menos en el 5C9 y 5C14 que presentaron desdiferenciación moderada.

Respecto a la detección de mutaciones, en los pacientes con adenocarcinoma de CRC se analizaron las mutaciones del sistema de reparación de DNA en los pacientes 5C2 y 5C4 resultado los tumores pMMR/MSS; en el paciente 5C1 no se realizó ningúnanálisis. En el caso de los adenocarcinomas (5C7, 5C9, 5C14 y 5C15) de pulmón se analizaron los genes *BRAF, P53, STK11, NRAS, ALK, ROS1* y *EGFR*, así como la sobreexpresión de PDL-1. Los resultados obtenidos revelaron en el paciente 5C9 positividad del 95% para PD-L1 y así como dos mutaciones somáticas, una en STK11 c.580G >A y otra en P53.En el paciente 5C14, también se detectó positividad para la PD-L1(20%) y la mutación en KRAS G12C. En el paciente 5C7 todos estos genes y proteína mencionados se presentaron en su estado nativo, mientras que en el paciente 5C15 solamente se analizó el estatus de las proteínas de los genes reparadores de erroresde replicación del DNA encontrándose conservadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El siguiente control de seguimiento se realizó a los pacientes pasados 6 meses tras la fecha de cirugía (Tabla 18). El primer dato relevante que hallamos es la supervivencia libre de enfermedad en el 100% los participantes.

En este intervalo de 6 meses, los pacientes que presentaron estadios tumorales más avanzados (5C1,5C4 y 5C7) recibieron tratamiento adyuvante con CAPOX en el casode los CRC y cisplatino/vinorelbina en el caso del adenocarcinoma de pulmón, manteniéndose todos libres de recidiva tras el tratamiento quirúrgico. En el caso del paciente 5C9, aunque la terapia adyuvante está aconsejada por las guías clínicas se descartó por avanzada edad y comorbilidades.

Tabla 18. Datos clínicos relativos al seguimiento de 6 meses post-cirugía dentro de la fase postquirúrgica

Fase postquirúrgica – Seguimiento 6 meses tras cirugía							
Variable/Paciente	**5C1**	**5C2**	**5C4**	**5C7**	**5C9**	**5C14**	**5C15**
Fecha seguimiento	3-May-2021	31-May-21	4-May-2021	30-Jul-2021	9-Sep-2021	27-Oct-2021	24-Nov-2021
Estado de seguimiento	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo
Estatus de supervivencia	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo
Progresión de la enfermedad	No	No	No	No	No	No	No
Nuevo cáncer	No	No	No	No	No	No	No
Tratamiento oncológico	Si, 4 ciclos CAPOX (11-Nov-20 al 29-Jan-2021)	No	Si, 8 ciclos CAPOX (15-Ene-21 a 3-Ago-21	Si, 4 ciclos cisplatino + vinorelbina (30-Abr-21 a 13-Jul-21)	No	No	No
Obtención muestras de sangre	Si (5C1-Post-P1-P7)	Si (5C2-Post-P1-P8)	Si (5C4-Post-P1-P8)	Si (5C7-Post-P1-P8)	Si (5C9-Post-P1-P8)	Si (5C14-Post-P1-P8)	Si (5C15-Post-P1-P8)
Incidencias	Insuficiente suero para 5C1-Post-P8)	No	No	No	No	No	No

En el seguimiento de 1 año tras la cirugía encontramos un 100% de supervivencia, aunque ya no un 100% de supervivencia libre de enfermedad. En esta ocasión, la paciente 5C14 presentó progresión del tumor intervenido en mayo del 2022, por metástasis pulmonares y mediastínicas para las que recibió tratamiento concomitante con CCRT y cuya mejor respuesta tumoral al mismo fue enfermedad estable.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para el resto de los pacientes no se objetivó progresión tumoral, aparición de un nuevo tumor ni indicios de ello en los controles periódicos clínicos y de imagen a los que se sometieron por práctica clínica habitual.

Tabla 19. Datos clínicos relativos al seguimiento de 1 año post-cirugía dentro de la fase postquirúrgica

Fase postquirúrgica – Seguimiento 1 año tras cirugía							
Variable/Paciente	**5C1**	**5C2**	**5C4**	**5C7**	**5C9**	**5C14**	**5C15**
Fecha seguimiento	11-Oct-2021	11-Oct-2021	15-Nov-2021	5-Abr-2022	13-Abr-2022	18-May-2022	9-Mar-2022
Estado de seguimiento	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo
Estatus de supervivencia	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo
Progresión de la enfermedad	No	No	No	No	No	Si	No
Nuevo cáncer	No	No	No	No	No	Si (May 2022)	No
Tratamiento oncológico	No	No	No	No	No	Si, CCRT con carboplatino/paclitaxel (15-Jul-2022 a 9-Ago-2022)	No
Respuesta al tratamiento oncológico	NA	NA	NA	NA	NA	EE	NA
Obtención muestras de sangre	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Incidencias	No	No	No	No	No	No	No

Finalmente, en el seguimiento realizado aproximadamente a los dos años tras la cirugía, obtenemos nuevamente una tasa de supervivencia del 100%. En cuanto a la recurrencia de la enfermedad, encontramos una nueva progresión en la paciente 5C14 en marzo del 2023 por crecimiento de lesiones en pulmón derecho ya conocidas, así como por la aparición de múltiples focos metastásicos a nivel pleural, ganglionar, hepático y óseo. Para su tratamiento se indicó tratamiento activo con pembrolizumab; fármaco del que solo pudo recibir un ciclo por empeoramiento del estado general y fallecimiento el 7 de abril de 2023, 1 día antes de cumplirse los dos años tras la cirugía.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 20. Datos clínicos relativos al seguimiento de 2 años post-cirugía dentro de la fase postquirúrgica

Fase postquirúrgica – Seguimiento 2 años tras cirugía							
Variable/Paciente	**5C1**	**5C2**	**5C4**	**5C7**	**5C9**	**5C14**	**5C15**
Fecha seguimiento	25-Oct-2022	25-Oct-2022	22-Nov-2022	27-Feb-2023	25-Abr-2023	17-Mar-2023	18-Abr-2023
Estado de seguimiento	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo	Activo
Estatus de supervivencia	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo
Progresión de la enfermedad	No	No	No	No	No	Si (Mar-2023)	No
Nuevo cáncer	No	No	No	No	No	No	No
Tratamiento oncológico	No	No	No	No	No	Si, (Pembrolizumab 1 ciclo el 17-Mar-2023, fallece 7-Abr-2023)	No
Respuesta al tratamiento oncológico	NA	NA	NA	NA	NA	No evaluable	NA
Obtención muestras de sangre	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Incidencias	No	No	No	No	No	No	No

4.2. Resultados referentes a la obtención y procesamiento de las muestras de sangre y tejido

Las muestras de sangre pre-cirugía fueron obtenidas con éxito en todos los pacientes. El proceso de extracción de suero y PBMCs se llevó a cabo atendiendo al protocolo descrito en el apartado 4 del capítulo de 3 de este texto.

En lo que atañe al desarrollo del proceso solamente se reportaron tres incidencias, dos en el paciente 5C1 y una en el paciente 5C15. En la paciente 5C1 la sangre fue obtenida 5 minutos tras el inicio de la preanestesia con midazolam y aunque esto es un criterio de exclusión de calidad de la muestra, se decidió continuar con los análisis al revisar en ficha técnica que este fármaco alcanza el efecto máximo a los 10 minutos tras su administración y que alcanza una biodisponibilidad máxima del 50%. Así mismo, el tiempo total de procesamiento de las muestras superó en 20 minutos las 4 horas establecidas como máximo permitido, atribuyéndose este hecho a las dificultades técnicas de la implementación del protocolo por primera vez.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 21. Datos relativos a la obtención y procesamiento de las muestras de sangre pre-cirugía

Fase quirúrgica – Datos obtención y procesamiento de la sangre pre-quirúrgica							
Variable/Paciente	**5C1**	**5C2**	**5C4**	**5C7**	**5C9**	**5C14**	**5C15**
Fecha extracción sangre pre-cirugía	14-Oct-2020	15.Oct-2020	3-Dec-2020	24-Feb-2021	5-Mar-2021	8-Abr-2021	21-Abr-2021
Nº de días antes de la cirugía	0	0	0	0	0	0	0
Hora de la extracción de la sangre pre-cirugía	9:10 am	8:50 am	9:04 am	9:00 am	10:25 am	9:00 am	10:00 am
Procedencia de la sangre	Arterial	Arterial	Arterial	Arterial	Arterial	Arterial	Arterial
Inicio extracción de suero	12:50 pm	10:10 am	9:30 am	9:05 am	10:25 am	9:30 am	10:15 am
Fin extracción de suero	14:00 pm	11:45 am	10:15 am	10:25 am	11:10 am	10:30 am	11:00 am
Cantidad de muestras de suero obtenidas	8 x 1ml (5C1-Pre-P1-8)	8 x1 ml (5C2-Pre-P1-8)	8 x 1ml (5C4-Pre-P1-8)	8 x1ml (5C7-Pre-P1-8)	8x1ml (5C9-Pre-P1-8)	8 x1ml (5C14-Pre-P1-8)	6 x1ml (5C15-Pre-P1-6)
Inicio purificación PBMCs	12:05 pm	11:55 pm	10:16 am	10:26 am	11:20 am	10:35 am	11:02 am
Fin purificación PBMCs	13:30 pm	12:30 pm	11:00 am	11:20 am	12:30 pm	12:00 pm	12:05 pm
Hora de inicio contaje celular	13:15 pm	12:15 pm	11:01 am	11:10 am	12:20 pm	11:45 am	11:55 am
Hora de fin contaje celular	13:20 pm	12:30 pm	11:10 am	11:15 am	12:25 pm	11:50 am	12:00 pm
Cantidad de células x ml	1x 10^6	15x 10^6	23x 10^6	8x 10^6	15x 10^6	12x 10^6	18x 10^6
Cantidad de muestras de PBMCs obtenidas	2 x 0.5ml (5C1-Pre-C1-2)	2 x 0.5ml (5C2-Pre-C1-2)	2 x 0.5ml (5C4-Pre-C1-2)	2 x 0.5ml (5C7-Pre-C1-2)	2 x 0.5ml (5C9-Pre-C1-2)	2 x 0.5ml (5C14-Pre-C1-2)	2 x 0.5ml (5C15-Pre-C1-2)
Tiempo desde extracción hasta fin del procesamiento	4h 20min	3h 40min	2h 6min	2h 20 min	2h 5 min	3h	2h 5 min
Incidencias	>4h Paciente pre - anestesiada con midazolam	No	No	No	No	No	Solo se obtienen 12 ml de sangre por ello no P7 ni P8

Por su parte, la incidencia reportada en el paciente 5C15 hace referencia a la cantidad de muestra obtenida, en este caso 6ml inferior a lo establecido por protocolo, lo que dio como resultado dos crioviales menos de suero disponibles.

Con respecto a las muestras de sangre extraídas en la fase postquirúrgica (post-cirugía, 6 meses, 1 año y 2 años tras cirugía) solamente se reportó una incidencia en la paciente 5C1 en la extracción de los 6 meses tras cirugía en la que no se pudo obtener uno de los 8 crioviales de suero indicados en el protocolo por porcentaje mayor del esperado de hematocrito en la muestra atribuible a variaciones fisiológicas sin relevancia clínica.

La cantidad de tejido tumoral obtenida fue en todos los casos superior a 150 mg garantizándose los requerimientos mínimos según protocolo. Además, también hubo muestra tumoral y de tejido sano para la obtención de Tp11, Tn7 y Tn8 en todos los participantes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los datos de mayor interés de esta compilación (Tabla 18), son los referentes al tiempo de isquemia fría al ser este uno de los criterios de exclusión que determinarán la viabilidad o no de la muestra para ser sometida a los análisis multiómicos.

A este respecto, se reportaron dos incidencias en los pacientes 5C1 y 5C2 en los que el tiempo de isquemia fría se superó en 5 y 2 minutos respectivamente. No obstante, se decidió someter a estas muestras a los siguientes controles de calidad al considerarse una desviación menor atribuible a factores técnicos en la implementación del protocolo.

Tabla 22. Datos relativos a la obtención y procesamiento de las muestras de tejido

Fase quirúrgica – Datos obtención del tejido							
Variable/Paciente	**5C1**	**5C2**	**5C4**	**5C7**	**5C9**	**5C14**	**5C15**
Fecha de la cirugía	14-Oct-2020	15-Oct-2020	3-Dic-2020	24-Feb-2021	5-Mar-2021	8-Abr-2021	21-Abr-2021
Procedimiento quirúrgico	Laparoscopia	Sigmoidectomía laparoscópica	Sigmoidectomía laparoscópica	Lobectomía VATS	Lobectomía VATS	Lobectomía VATS	Lobectomía VATS
Hora de inicio de la anestesia	8:30 am	8:59 am	9:06 am	9:10 am	9:55 am	9:10 am	10:15 am
Pre-medicaicón	8:30 am	8:59 am	9:06 am	9:10 am	9:55 am	9:10 am	10:15 am
Hora de inicio de la cirugía	9:32am	9:30 am	9:15 am	9:50 am	10:30 am	9:40 am	10:20 am
Vasos ligados/hora	-Vena mesentérica inferior 10:00 am	-Vena rectal superior 10:56 am	-Vena mesentérica inferior 10:15 am	-Vena pulmonar inferior 11:14 am	-Arteraia basal (23:38 pm) -Vena pulmonar inferior (13:40 pm)	-Vena pulmonar 10:36 am -Arteria segmentaria VI 10:43 am -Arteria basal 10:46 am	-Vena pulmonar inferior 11:05 am -Arterias segmentales 8, 9 y 10 12:10 am -Arteria segmental 8 12:15 am
Hora de inicio de la resección	9:48 am	10:56 am	9:30 am	11:00 am	12:30 pm	9:40 am	10:30 am
Hora de fin de la resección	11: 44 am	11:26 am	12:25 pm	12:33 pm	14:15 pm	11:15 am	12:45 pm
Hora pieza quirúrgica *ex vivo*	11:44 am	11:26 am	12:47 pm	12:46 pm	14:18 pm	11:20 am	12:50 pm
Hora fin de la cirugía	12:33pm	12:07pm	13:25pm	13:45 pm	15:15 pm	11:25am	13:15 pm
Localización anatómica de la pieza	Rectosigma	Sigma	Sigma	Lóbulo inferior derecho	Lóbulo inferior derecho	Lóbulo inferior derecho	Lóbulo inferior izquierdo
Tamaño de la pieza	29 cm	30 cm	25cm	15x12x7 cm	15x12,5x2	12x9x6 cm	15x8x2 cm
Hora de inicio del tallado	11:49 am	11:30 am	12:52 pm	12:50 pm	14:23 pm	11:25 am	12:55 pm
Peso de la muestra obtenida da tejido tumoral	480 mg	390 mg	440mg	500mg	440mg	359mg	360mg
Peso de la muestra obtenida de tejido sano	433 mg	428 mg	420mg	410mg	450mg	330mg	360mg
Hora muestras en N_2	11:59 am	11:38 am	12:57 pm	12:56 pm	14:28 pm	11:30 am	13:00 pm
Hora muestras en formalina	11:59 am	11:38 am	12:57 pm	12:56 pm	14:28pm	11:30 am	13:00 pm
Cantidad de muestras obtenidas	4 (Tp1, Tp11, Tn7, Tn8)	4 (Tp1, Tp11, Tn7, Tn8)	4 (Tp1, Tp11, Tn7, Tn8)	4 (Tp1, Tp11, Tn7, Tn8)	4(Tp1,Tp11, Tn7,Tn8)	4(Tp1,Tp11, Tn7, Tn8)	4 (Tp1, Tp11, Tn7, Tn8
Tiempo de isquemia fría	15 min	12 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min
Incidencias	Isquemia fría >10 min	Isquemia fría >10 min	No	No	No	No	No

4.3. Variaciones genómicas obtenidas de la WGS

4.3.1. Variaciones somáticas

En esta sección se listan las variaciones somáticas, así como las amplificaciones y deleciones del tejido tumoral de los pacientes participantes, obtenidas como resultado de la WGS.

La cobertura de secuenciación de la WGS obtenida para el tejido tumoral y el tejido normal de cada paciente y las de su cohorte control correspondiente se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23. Cobertura de la secuenciación WGS

Cobertura de secuenciación de la WGS				
Paciente	**Paciente:Tumor**	**Paciente:Normal**	**Cohorte:Tumr**	**Cohorte:Normal**
5C1	73.1	43.3	85.2	43.8
5C2	70.7	38.9	82.75	43.50
5C4	72.7	45.3	87.35	44.1
5C7	70.0	35.5	83.25	42.55
5C9	68.6	34.1	83.55	42.15
5C14	65.8	32.5	82.95	41.9
5C15	61.5	31.6	83.0	42.9

Los resultados de las variaciones somáticas identificadas se muestran agrupados en las siguientes 4 categorías: (A) mutaciones somáticas en genes que tienen un tratamiento aprobado por la FDA; (B) mutaciones somáticas en genes para los que la FDA tiene un tratamiento aprobado en otro tipo de tumor (uso fuera de indicación u *off label*); (C) mutaciones somáticas en genes que se están testando en uno o varios ensayos clínicos pero que aún no han sido aprobados por la FDA; y (D) mutaciones somáticas en genes para los que no hay ningún fármaco a estudio en EECC ni tienen un medicamento aprobado por la FDA pero si están contempladas en la base de datos CIViC.

Cabe destacar que la clasificación solo se basa en el símbolo del gen, pero no en la mutación específica en sí.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 24. Mutaciones somáticas registradas por paciente

Paciente	Gen	Posición	AA original	Alteración	VAF (%)	Categoría
5C1	No se reportan mutaciones					
5C2	*BRAF*	594	Asp	Glu	16.4	C
	CSF3R	272	Pro	Leu	19	C
5C4	*RET*	1031	Asp	Asn	57.1	B
	RET	1031	Asp	Asn	57.1	C
5C7	*KRAS*	61	Gln	His	40.6	A
	NTRK3	561	Glu	Stop	35	A
5C9	*ALK*	1388	Gln	Lys	31	A
	NTRK3	138	Asp	Glu	14.6	A
	AR	790	His	Gln	16.2	C
	ATR	2007	Gly	Desplazamiento del marco de lectura	16.9	C
	CSF3R	270	His	Leu	13.3	C
	EGFL7	234	Pro	Gln	7.6	C
	EGF2	181	Arg	Leu	13.6	C
	FLT4	1152	Trp	Cys	22.9	C
	POLD1	344	Trp	Cys	22.3	C
	TP53	248	Arg	Leu	17.4	C
5C14	*KRAS*	12	Gly	Cys	34.3	A
	CYP19A1	21	Leu	Phe	21.4	C
	HGF	468	Arg	Leu	40	C
	PIK3R2	648	Glu	Stop	26.8	C
5C15	*KRAS*	12	Gly	Asp	10.2	A
	TP53	156	Arg	Duplicación	9.3	C

En lo que respecta a las mutaciones clasificadas en el grupo A, los 4 pacientes con adenocarcinoma de pulmón presentaron al menos una mutación de estas características mientras que en el grupo diagnosticado con adenocarcinoma de CRC no lo hizo ninguno.

El paciente 5C7 presenta una mutación del grupo A en el gen *KRAS* en la posición (codón) 61 por sustitución del aminoácido histidina por glutamina con una frecuencia de aparición en la población caucásica o lo que es lo mismo, con una frecuencia alélica del 40.6%, pudiendo concluir que estamos ante una mutación frecuente. Los tratamientos aprobados por la FDA para *KRAS* mutado en adenocarcinoma de pulmón pueden verse en el capítulo 1, sección 3.1.4. Para esta variable mutacional en concreto, no hay fármacos aprobados por la FDA, aunque si hay evidencia biológica testada en

USC DE COMPOSTELA

ensayos de que esta es un marcador de respuesta favorable a los siguientes fármacos: trametinib, cobimetinib, binimetinib.

Este mismo paciente presenta otra mutación del grupo A en el gen *NTRK3* en laposición 561 por introducción de una secuencia de parada (stop) en el lugar de la secuencia de traducción donde debería encontrarse un ácido glutámico con una frecuencia alélica del 35%. Los tratamientos aprobados por la FDA para traslocaciones de *NTRK3* son el entrectinib y el larotrectinib, siendo desconocida la significancia de la variable mutacional de este gen hallada en el paciente.

Por su parte, el paciente 5C9 dentro del grupo A presenta mutación en el gen *ALK* en la posición 1388 por sustitución del aminoácido ácido glutamina por lisina con una frecuencia alélica del 31%. Además, este paciente también presenta una mutación del grupo A en *NTRK3* en la posición 138 por sustitución de un ácido aspártico por un ácido glutámico y con una frecuencia alélica del 14.6%, notablemente inferior a los casos anteriores. Los fármacos aprobados para *ALK* mutado en adenocarcinoma de pulmón puede verse en el capítulo 1, sección 3.1.4, mientras que los fármacos para *NTRK3* se mencionan en el apartado anterior. En este caso, las variables mutacionales específicas de ambos genes han sido asociadas con efectos oncogénicos a nivel alélico no de posición, aunque por el momento no hay más información disponible.

La paciente 5C14, presenta la variante mutacional de *KRAS* provocada por la sustitución del aminoácido glicina por el aminoácido cisteína en la posición 12. Esta mutación es una de las más reconocidas presentando una frecuencia alélica del 34.3% y teniendo los siguientes fármacos aprobados por la FDA: sotorasib (también aprobado por la EMA) y adagrasib.

Curiosamente, el paciente 5C15 también presenta mutación del grupo A en *KRAS* en la posición 12, aunque en esta ocasión la sustitución de la glicina viene dada por un ácido aspártico. Esta variable mutacional de *KRAS* presenta una frecuencia alélica del 10.2%, muy inferior a las presentadas en el caso de los pacientes 5C7 y 5C14, por lo que representa una menor relevancia para nuestra población objetivo. Los fármacos aprobados por la FDA son los mismos que los mencionados para el paciente 5C14, aunque esta variable mutacional de *KRAS* al igual que ocurría con la presentada por el paciente 5C7 se ha relacionado con la aparición de respuesta favorable a los tratamientos trametinib, cobimetinib y binimetinib.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Con respecto a las mutaciones clasificadas en el grupo B, solamente se ha encontrado una en el paciente 5C4 en el gen *RET* por sustitución de un ácido aspártico por una asparagina en la posición 1031. Esta variante presenta la frecuencia alélica más elevada de las registradas en este estudio con un 57.1% Los fármacos aprobados para lostumores con fusión positiva de *RET* se recogen en el capítulo 1, sección 3.1.4. En el caso de esta variable mutacional de *RET* concreta el significado biológico y oncogénico es desconocido.

En lo concerniente a las mutaciones para las que actualmente se están desarrollando un EECC, pero no tienen un fármaco aprobado por la FDA podemos decir que estas han sido las que han presentado mayor prevalencia de aparición en los pacientes incluidos en este ensayo representando el 68% del total de mutaciones detectadas.

Por una parte, en los pacientes con adenocarcinoma de CRC encontramos en el paciente 5C2 mutaciones en los genes *BRAF* y *CSF3R*. La primera mutación viene dada por la sustitución de un ácido aspártico por un ácido glutámico en la posición 594 mientras que en la segunda viene dada por la sustitución de una prolina por una leucina en la posición 272. Ambas mutaciones presentan una frecuencia alélica inferior el 20%. Los estudios preclínicos llevados a cabo hasta ahora han demostrado que esta mutación específica en *BRAF* es potencialmente oncogénica, pues estudios in vivo realizados con ratones *knock-in* que expresan esta mutación han revelado un aumento en la actividad de la vía MAPK. Por este motivo, estudios *in vitro* han sugerido que esta mutación esun marcador de resistencia del fármaco dabrafenib, pero también es un marcador de respuesta al tratamiento con trametinib, ambos fármacos reguladores positivos y negativos de esta vía respectivamente.

Por otra parte, el significado biológico de la mutación en *CSF3R* es desconocido. Un ejemplo de ensayo clínico en desarrollo en tumores de CRC para *CSF3* es el NCT04166604 que evalúa la optimización de la eficacia del tratamiento con TAS-102 cuando se administra con filgrastim.

Siguiendo con los pacientes con adenocarcinoma de CRC la mutación descrita para el paciente 5C4 dentro del grupo B es también clasificable dentro del grupo C. Algunos de los ensayos clínicos tipo *basket* en desarrollo donde son elegibles los tumores deCRC con mutación positiva de *RET* son: para ponatinib el NCT02272998, para selpercantinib el Libretto-001 (NCT03157128), para alectinib el NCT03194893, para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

sunitinib el NCT02450123, para pralsetinib el ARROW (NCT03037385) y para RXDX-105 el NCT01877811. Todos estos ensayos se encuentran en fase de desarrollo temprana y están indicados en tumores avanzados o recurrentes.

Continuando con el grupo de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón, destaca el paciente 5C9 en el cual se han encontrado 8 mutaciones del grupo C y un total de 10 mutaciones, concentrándose en este paciente un 45% de todas las mutaciones halladas.

De estas 8 variables mutacionales, actualmente no se conoce el potencial biológico ni oncogénico de *AR, ATR, CSF3R, EGFL7, FGF2, FLT4* o *POLD1* (ver

Tabla 24 para más información sobre posición, tipo de alteración y VAF). Algunos de los ensayos clínicos en desarrollo para el símbolo del gen de estas mutaciones son: para *ATR* el GUIDE2REPAIR(NCT0416984) que evalúa la combinación de inmunoterapia con olaparib, el NCT02797964 que evalúa la molécula SRA737, el NCT03150810 que evalúa la combinación de BGB-290 con temozolamide y el Toca 6 (NCT02576665) queevalúa la combinación de Toca 511 con Toca FC. Para el gen *FLT4* encontramos el NCT02795156 que evalúa la eficacia de las combinación de las terapias dirigidasafatinib, regorafenib y cabozantinib y el NCT02299141cuyo fármaco en investigaciónes el nintedanib.Finalmente, para *POLD1* encontramos el ensayo TAPUR (NCT02693535) que prueba los medicamentos aprobados por la FDA que se dirigen a una anomalía específica en el gen tumoral. Nuevamente estos ensayos se encuentran en su mayoría en fase temprana de desarrollo y se están llevando a cabo en pacientes con enfermedad avanzada.

Con respecto a la variable mutacional hallada en *TP53*, estudios *in vivo* con ratones *knock-out* han dado como resultado una transactivación disminuida de los genes dianade p53. También ensayos con líneas celulares han puesto de manifiesto la incapacidadde reajustar la proliferación celular por apoptosis en comparación con aquellas células carentes de esta mutación. Ambos resultados, sugieren que la presencia de esta mutación lleva a la pérdida de función del gen. Los ensayos clínicos actualmente en desarrollo para *PT53* mutado en adenocarcinoma de pulmón son: para la combinaciónde APR-246 con pembrolizumab el NCT04383938, para la combinación de osimertinib con un platino y etopósido el NCT03567642, para fludarabina el NCT03412877, para SRA737 el NCT02797964, para la combinación de Toca 511 con Toca FC el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

NCT02576665, para nintedanib el NCT02299141, para pazopanib el NCT02193152 y para el M6620 en combinación con terapia citotóxica el NCT02157792.

Por su parte, la paciente 5C14 presentó 3 mutaciones del grupo C, la primera en el gen CYP19A1 por sustitución de una leucina por una fenilalanina en la posición 21. El significado biológico y oncogénico de esta variable es desconocido. El ensayo que actualmente está en curso para CY19A1 es el NCT04557449.

La segunda mutación se halló en el gen *HGF* concretamente la posición 468 por sustitución de una arginina por una leucina, destacando en esta ocasión la elevada VAF del 40%. El significado biológico y oncogénico también es desconocido en este caso. El EECC que se está llevando a cabo actualmente para adenocarcinoma de pulmón con mutación positiva de *HGF* es el NCT02576665 que evalúa la combinación de los fármacos Toca 511 y Toca FC.

La tercera y última de estas mutaciones se localizó en el gen *PIK3R* debido a la introducción de una secuencia de stop en la posición 648 donde cabría esperar un ácido glutámico. Para esta variable mutacional también se desconoce el valor biológico. El EECC en curso a este respecto es el NCT01610336 que evalúa la eficacia de la combinación de INC280 con gefitinib.

El paciente 5C15 este presentó una sola mutación del grupo C en el gen TP53 en la posición 156 por duplicación del aminoácido arginina. Esta mutación se ha puesto en relación con la presencia de alteraciones en el dominio de unión de la proteína p53 con el DNA cursando con una pérdida de función de esta vía de inhibición oncogénica. Los EECC actualmente en curso para *TP53* son los ya mencionados en el paciente 5C9.

Finalmente, con respecto al análisis del estatus mutacional cabe destacar que para la paciente 5C1 no se registró ninguna mutación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 25. Amplificaciones y deleciones en genes somáticos detectadas por paciente.

Amplificaciones y deleciones somáticas detectadas por WGS			
Paciente	**Amplificación**	**Deleción**	**Categoría**
5C1	*CDK6*	-	B
	CSF3R	*MTOR*	C
	FLT1	*PIK3CD*	C
	FLT3	*PIK3R1*	C
5C2	No se reportan		
5C4	*TOP1*	-	C
5C7	-	*FYN*	C
5C9	*KRAS*	-	A
5C14	No se reporta		
5C15	No se reportan		

En lo que respecta a la presencia de amplificaciones y deleciones detectadas, cabe mencionar que no se encontró ninguna de estas variables genéticas en los pacientes 5C2, 5C14 ni 5C15. Para el resto de los pacientes las amplificaciones y deleciones se clasificarán en las mismas 4 categorías que las mutaciones anteriormente descritas.

Dentro del grupo A encontramos una amplificación o aumento del número de copias de *KRAS* en el paciente 5C9. Estudios *in vitro* han demostrado que la sobrexpresión de proteínas derivada de esta amplificación confiere resistencia a los fármacos crizotinib, cetuximab o panitumumab entre otros. Los fármacos aprobados por la FDA para *KRAS* mutado pueden verse en el capítulo 1, sección 3.1.4.

En el grupo B, el paciente 5C1 presenta una amplificación del gen *CDK6*. La sobreexpresión de *CDK6* da lugar a un aumento en la proliferación y transformación celular íntimamente relacionado con la progresión de la enfermedad oncológica. Los fármacos aprobados para *CDK6* en otros tumores no CRC son el olaparib en cáncer de próstata.

Por último, dentro del grupo C se detectaron 3 ampliaciones en al paciente 5C1 para los genes *CSF3R*, *FLT1* y *FLT3*. Así mismo se detectó una amplificación del gen *TOP1* en el paciente 5C4. De las amplificaciones detectadas en 5C1 no se conocen las implicaciones biológicas en el desarrollo del adenocarcinoma de CRC. Con respecto a la amplificación de *TOP1* en adenocarcinoma de pulmón, se ha identificado como un evento genómico frecuente con potencial actividad oncogénica, aunque por el momento no se dispone de más información. Un ejemplo de ensayo clínico para *TOP1* para adenocarcinoma de pulmón es el NCT04514497 que evalúa la combinación de un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inhibidor de TOP1 en combinación con la molécula experimental BAY 1895344 en estadio avanzados.

Con respecto a las deleciones, todas las registradas se clasifican dentro del grupo C. En este caso, encontramos 3 en el paciente 5C1 en los genes *MTOR, PIK3CD* y *PIK3R1*; y una en el paciente 5C7 en *FYN*. Para las dos primeras del paciente 5C1 no se conocen los efectos posibles oncogénicos mientras que la tercera de ellas si se le ha atribuido efecto oncogénico en adenocarcinoma de CRC. En el caso del paciente 5C7, el significado biológico de la deleción de *FYN* es desconocido.

4.3.2. Variaciones germinales

En esta sección se ofrece una visión global de los datos obtenidos referentes a las mutaciones que presentan los pacientes en línea germinal tras el análisis de las muestras de tejido por NGS.

La información referente a las mutaciones detectadas en línea germinal no solamente atañe al paciente implicado en el proyecto sino a sus familiares que no han proporcionado consentimiento para participar en este estudio. Por este motivo, en el momento en el que se produce y publica este texto solamente se muestra el número total de mutaciones germinales detectadas de aquellas seleccionadas para cada patología descritas en la tabla 13 y no se hace referencia al gen concreto en el que se ha detectado la mutación.

Así pues, en orden creciente, en los pacientes 5C4, 5C7,5C14 y 5C15 se detectó un gen mutado, en el paciente 5C9 se detectaron dos genes mutados, en el paciente 5C2 tres genes mutados y en el paciente 5C1 cuatro genes mutados.

4.3.3. Firmas mutacionales basadas en las variaciones somáticas obtenidas a partir de WGS

Las mutaciones somáticas pueden estar causadas en cada cáncer por múltiples procesos. Algunos de estos procesos se comportan siguiendo un patrón característico y fijo, es decir, dejan una firma mutacional. Estas firmas mutacionales, pueden ayudar a identificar procesos intrínsecos celulares y por ende actuar como biomarcadores de la respuesta y el pronóstico de las distintas terapias farmacológicas antineoplásicas.

En los diagramas de caja que se muestran en este apartado, puede verse la contribución de firmas mutacionales de DNA seleccionadas (para más información ver ANEXO 6)

USC DE COMPOSTELA

en función de posibles opciones terapéuticas al panorama genómico del tumor de cada paciente. La frecuencia de contribución puede oscilar entre 0 y 1 (se considerará significativo si el resultado >0.2), siendo un valor más elevado identificador de un mayor número de procesos mutacionales que contribuyen a la firma.

Los círculos azules que pueden observarse dentro de los diagramas de caja (ordenados por promedio creciente) representan casos de la cohorte control de cada paciente,mientras que los triángulos rojos representan la situación de un paciente concreto de interés. Si este triángulo rojo no se representa, esto indica que el perfil del paciente no representa una contribución significante a la firma mutacional.

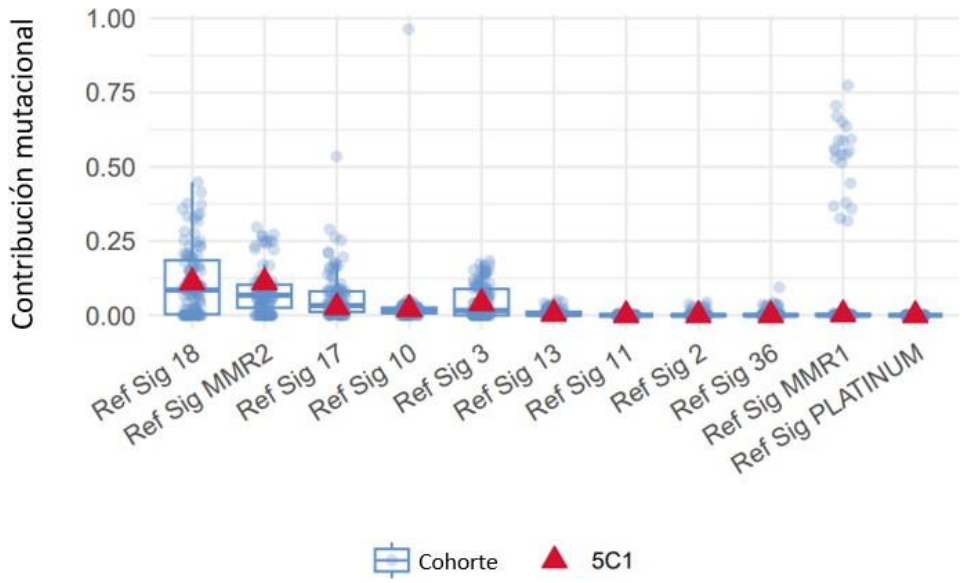


Figura 14. Contribución mutacional del paciente 5C1 a las firmas mutacionales

En el paciente 5C1 podemos ver que el paciente presenta contribución a todas las firmas mutacionales, aunque a ninguna de ellas lo hace de manera significativa. De entre todas, destacan los resultados presentados para *RefSig MMR1*. Mientras que el valor obtenido para el paciente es 0, la cohorte pese a presentar un rango intercuartílico muy estrecho, es decir una dispersión de datos baja si podemos observar una alta presencia de valores atípicos (21 pacientes de 100) cuyo perfil mutacional representa una contribución a esta firma. A través de estos resultados podríamos inferir que el paciente presenta un adenocarcinoma de CRC con baja carga mutacional y estabilidad de microsatélites

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

frente a una cohorte donde el porcentaje de pacientes con inestabilidad de microsatélites el ligeramente superior al esperado.

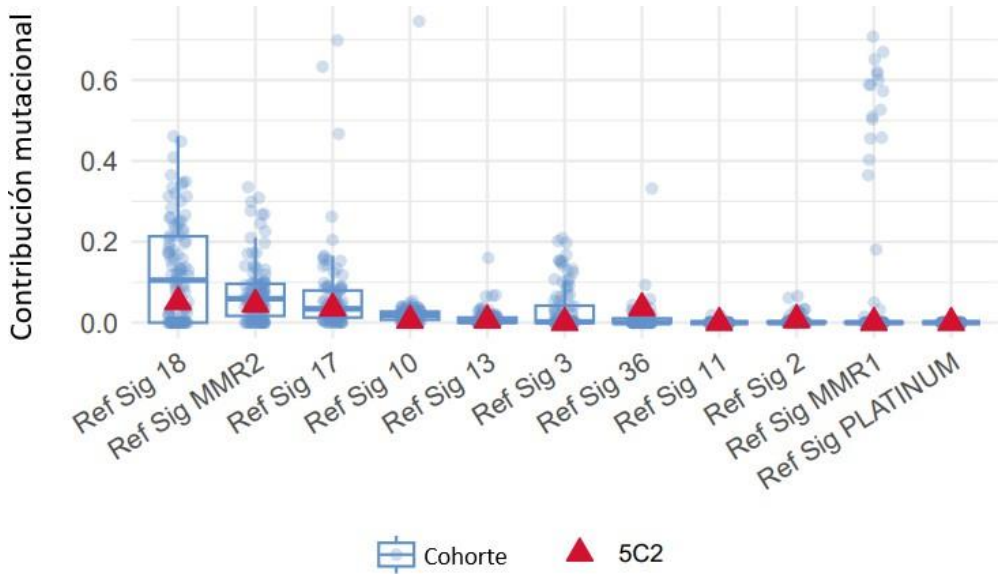


Figura 15. Contribución mutacional del paciente 5C2 a las firmas mutacionales

En cuanto al paciente 5C2 los resultados expuestos en el diagrama de cajas reflejan la no contribución mutacional estadísticamente significativa del paciente con ningunafirma mutacional, así como una distribución homogénea de los resultados con respecto ala cohorte.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

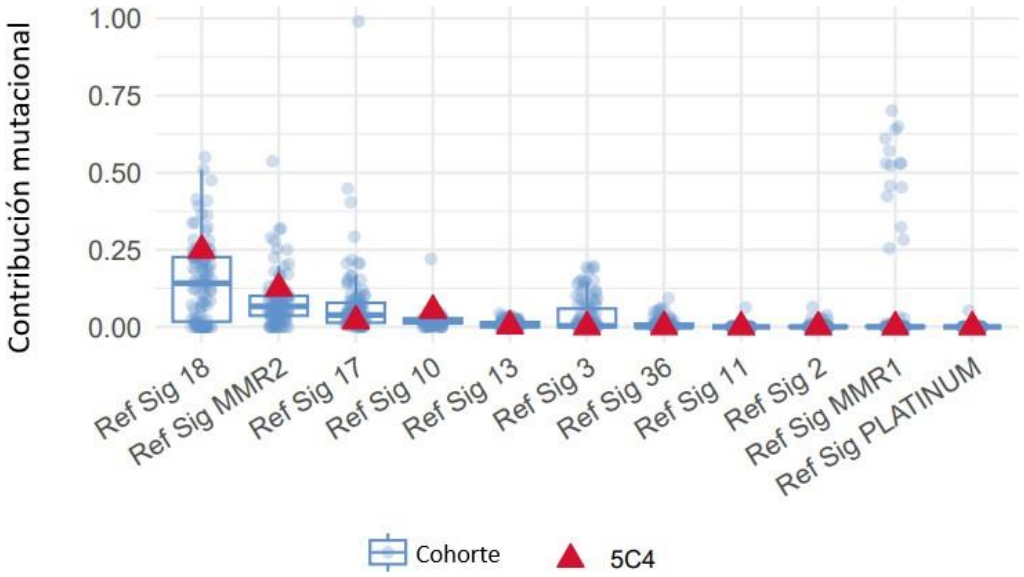


Figura 15. Contribución mutacional del paciente 5C4 a las firmas mutacionales

Por su parte, el paciente 5C4 presenta contribución estadísticamente significativa a la firma mutacional *RefSif 18*, siendo el único de los pacientes con adenocarcinoma de CRC en presentar contribución a alguna de las firmas seleccionadas.

Este hallazgo, pone de manifiesto un elevado número de mutaciones por sustitución de bases de citosina por bases de adenina como consecuencia de la oxidación de guanina inducida por radicales libres. En este caso, el paciente no presenta mutaciones conductoras en ninguno de los genes clásicamente relacionados con esta firma mutacional (*TP53, APC, NOTCH1* y *NEF2L2)*, por lo que habrá que valorar la posible contribución de *RET* (mutación conductora que si presenta el paciente) con esta firma mutacional.

Siguiendo el análisis por el paciente 5C7; el primero del grupo con adenocarcinoma de pulmón, no se evidencian contribuciones estadísticamente significativas, no presentando tampoco ningún valor llamativo frente a su cohorte control.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

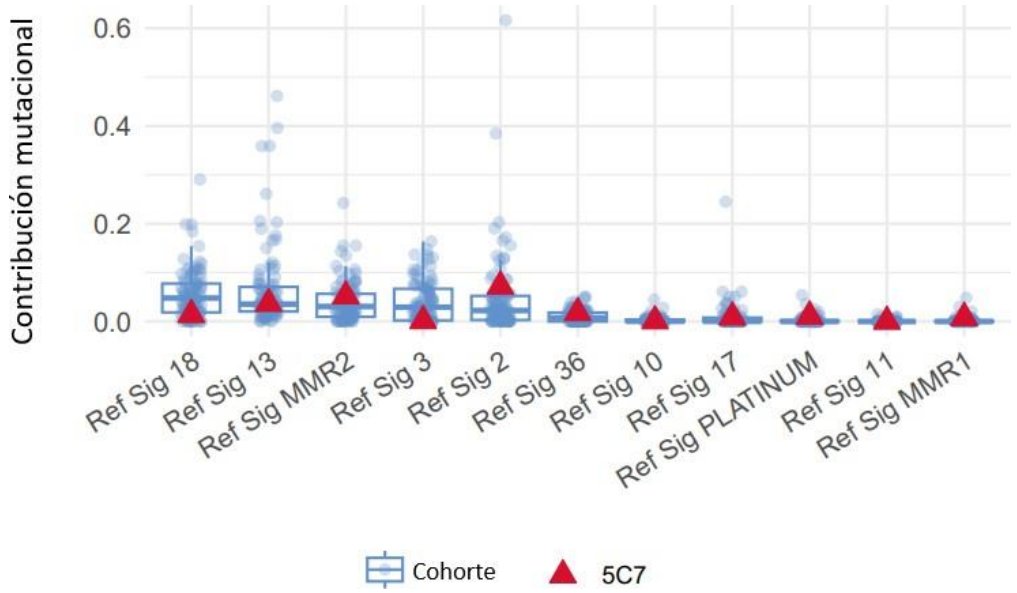
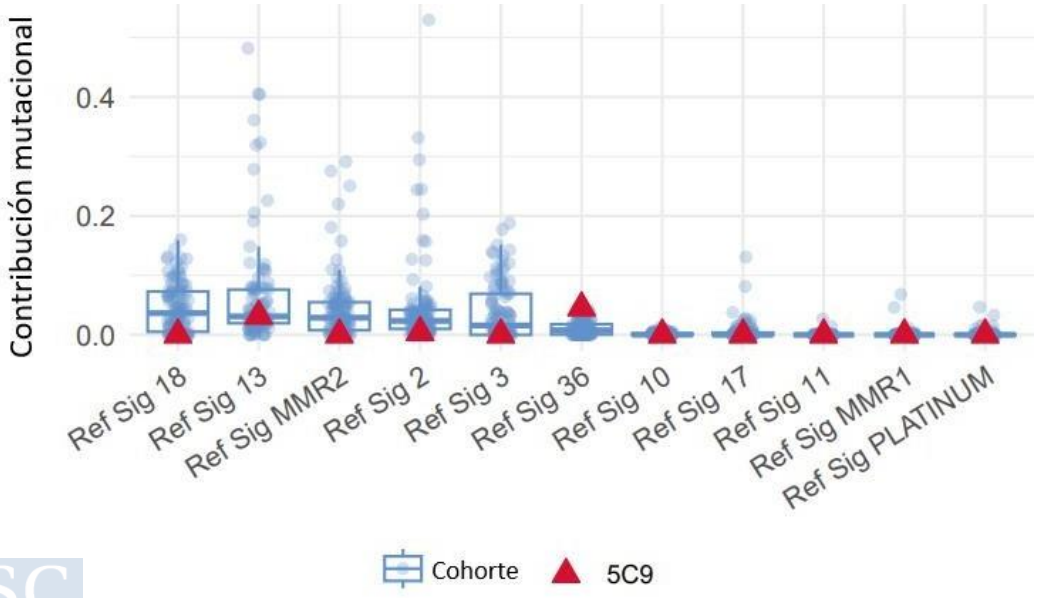


Figura 16. Contribución mutacional del paciente 5C7 a las firmas mutacionales

Por su parte, en el paciente 5C9 tampoco se observa ninguna contribución a las firmas mutaciones significativamente estadísticas presentando valores consonantes con los representados para la cohorte control, únicamente presentando un valor ligeramente superior para *RefSig 2*.



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 17. Contribución mutacional del paciente 5C9 a las firmas mutacionales

Continuando con el paciente 5C14 encontramos nuevamente un patrón similar al de los pacientes 5C7 y 5C9 no pudiéndosele atribuir ninguna contribución a las firmas mutacionales y siendo aquella en la que tiene mayor representatividad la *RefSig 2.*

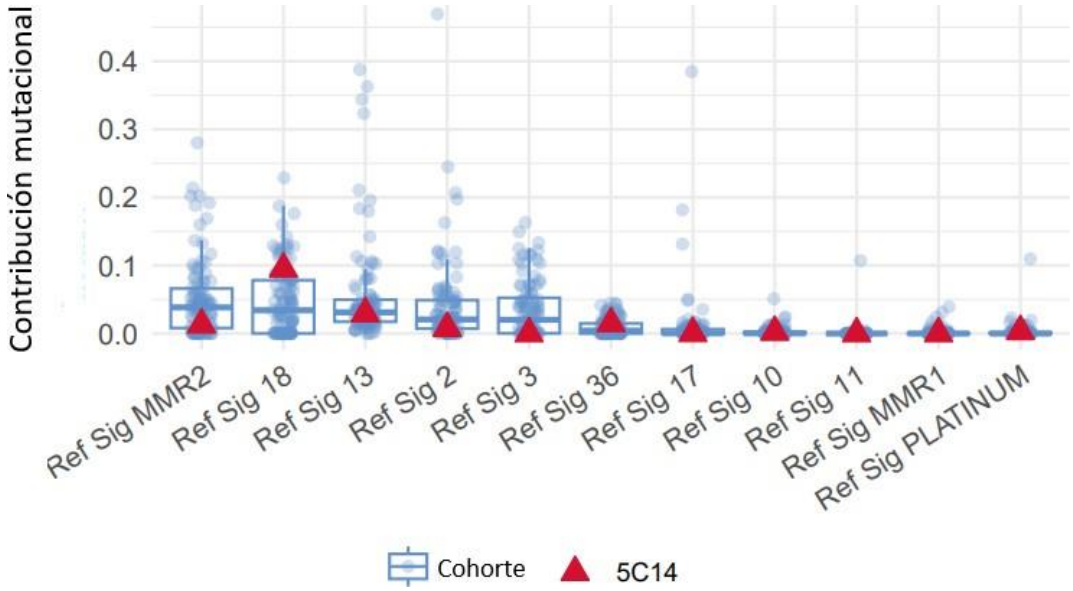


Figura 18. Contribución mutacional del paciente 5C14 a las firmas mutacionales

Finalmente, en el paciente 5C15 si se detectó una contribución en la firma mutacional *MMR2*, siendo este el único de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón en presentar resultados estadísticamente significativos. Esta firma mutacional suele producirse por SNV asociados a la presencia de deficiencias en el sistema de reparación de errores en el DNA. En este caso, no se detectaron mutaciones conductoras enninguno de los genes asociados con esta firma mutacional (*MSH2*, *MSH6*, *PMS2*,*MLH1*, *RPL22*, *MMR2*), por lo que deberá evaluarse la influencia de las mutaciones conductoras en *KRAS* o *TP53* que sí presenta el paciente sobre esta firma mutacional. Con respecto a las terapias farmacológicas, las firmas mutacionales relacionadas con la MMR se asocian con sensibilidad a los inhibidores de la topoisomerasa, aunque actualmente el topotecán no está aprobado para adenocarcinoma de pulmón, pero sí bajoensayo clínico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

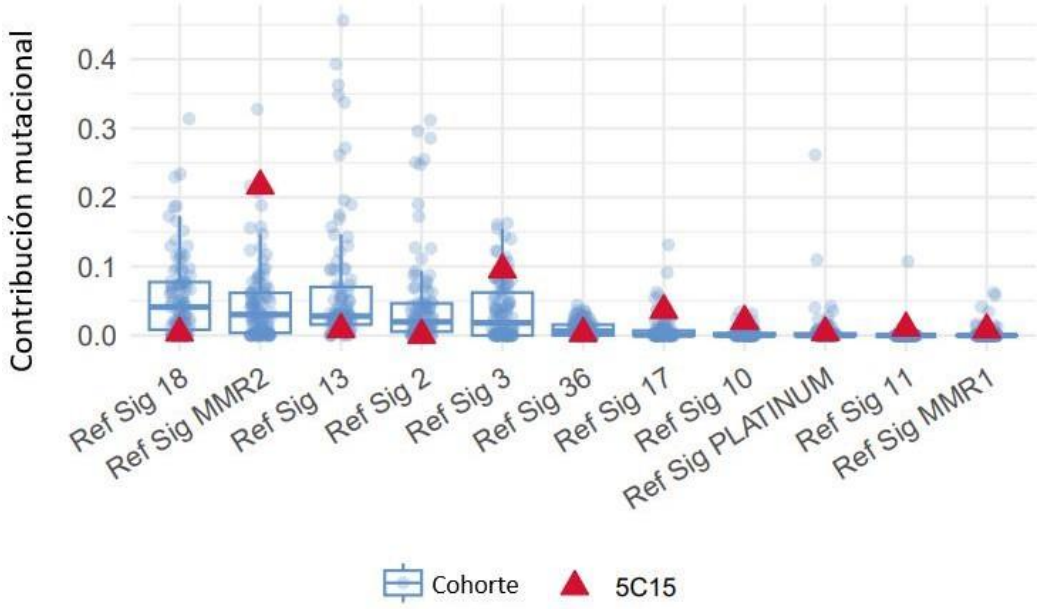


Figura 19. Contribución mutacional del paciente 5C15 a las firmas mutacionales

4.4. Marcadores de inmunoterapia

4.4.1. Marcadores inmunitarios: Carga mutacional tumoral (TMB)

En este apartado, se muestra el resultado de la carga mutacional tumoral (TMB, del inglés "*Tumor Mutational Burden"*) para cada paciente. El TMB es variable entre distintos tipos de cáncer por lo que para cada paciente se proporciona en el diagrama de cajas un contexto de su tipo de cáncer basado en el número de mutaciones por mega base registrado en los pacientes de su cohorte control. Los resultados de cada uno de lospacientes de interés se presentan con un triángulo rojo.

El TMB se calculó como el número de variantes somáticas registradas por paciente dividido por la longitud del genoma (300Mb) (habiéndose eliminado las regiones de mapeo problemáticas).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

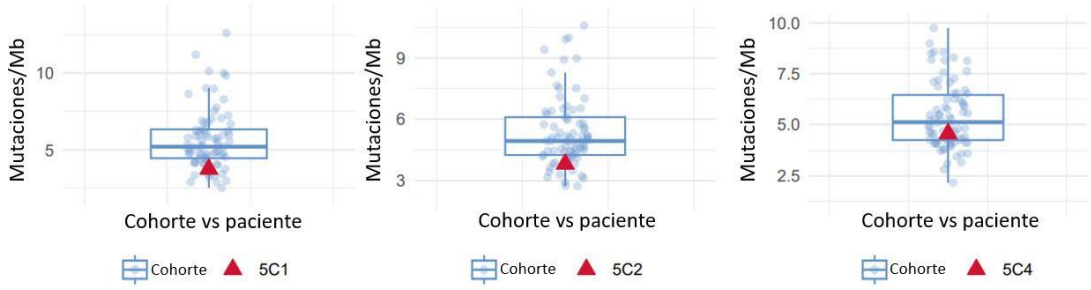


Figura 20. TMB de los pacientes con adenocarcinoma de CRC

Para el grupo de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de CRC los valores de TMB obtenidos fueron los siguientes:

- 5C1: TMB del paciente= 3,7 mutaciones/Mb; TMB de la cohorte [25%,75%]= [4,5 ;6,3]
- 5C2: TMB del paciente= 3,8 mutaciones/Mb; TMB de la cohorte [25%,75%]= [4,3 ;6,1]
- 5C4: TMB del paciente= 4,6 mutaciones/Mb; TMB de la cohorte [25%,75%]= [4,2 ;6,5]

Aunque aún no se han establecido valores concretos en las guías de práctica clínica para harmonizar a partir de qué valor o valores se considera que los pacientes presentan una carga mutacional elevada y por tanto son potencialmente mejores candidatos a obtener una buena respuesta terapéutica al tratamiento con inmunoterapia, se ha inferido a través de diversos ensayos como el CheckMate 227 que este valor podría situarse en ≥10 mutaciones/Mb en tejido y ≥15 mutaciones/Mb en biopsia líquida.

Siguiendo esta hipótesis los 3 pacientes presentarían una carga mutacional baja con resultados inferiores a la media de la cohorte. Por este motivo, estos pacientes no serían en principio candidatos a recibir tratamiento con inmunoterapia.

Si hablamos de los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón, se registraron los siguientes resultados para el análisis de la carga tumoral de sus tumores:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- 5C7: TMB del paciente= 2,6 mutaciones/Mb; TMB de la cohorte [25%,75%]= [5,4 ;10,8]
- 5C9: TMB del paciente= 27,7 mutaciones/Mb; TMB de la cohorte [25%,75%]= [7,9 ;17.7]
- 5C14: TMB del paciente= 8,3 mutaciones/Mb; TMB de la cohorte [25%,75%]= [5,5 ;12,1]
- 5C15: TMB del paciente= 0,9 mutaciones/Mb; TMB de la cohorte [25%,75%]= [4,8 ;12,5]

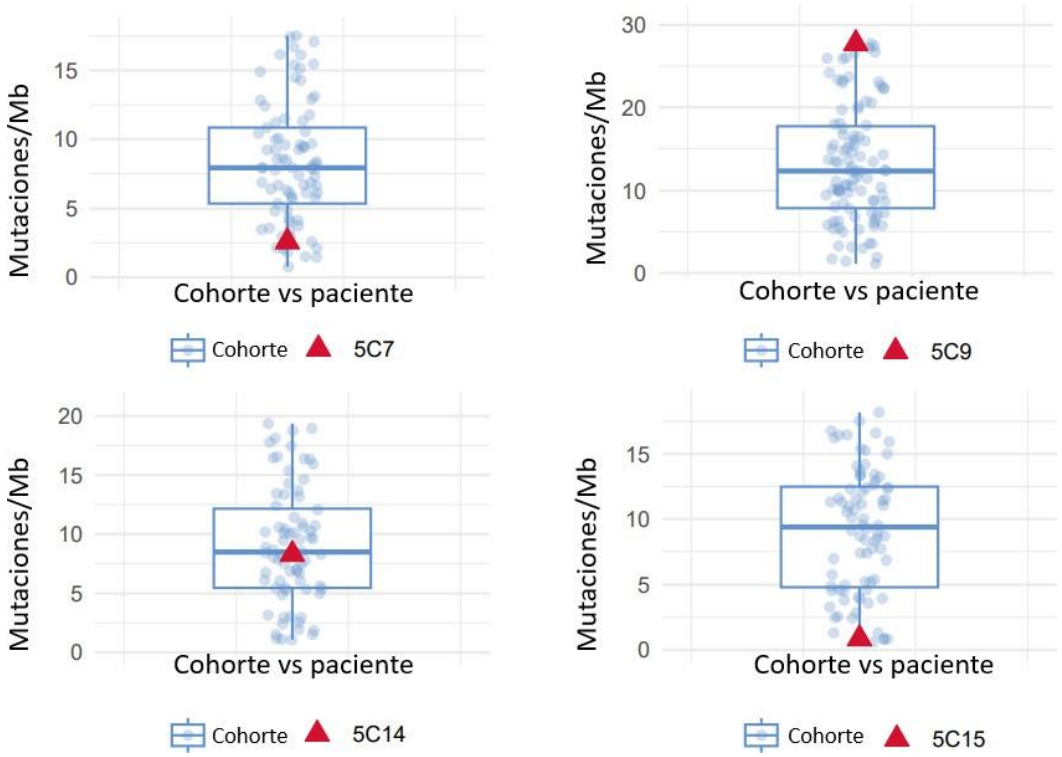


Figura 21. TMB de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón

En este caso, podemos observar que los pacientes 5C7 y 5C15 se sitúan por debajo el primer cuartil, es decir, los valores obtenidos para la carga mutacional de estos pacientes representan al 25% de los pacientes con esta enfermedad.

Por su parte, el valor del paciente 5C14 se sitúa en la media de la cohorte representando el perfil esperado para esta enfermedad. Finalmente, en el paciente 5C9 se ha registrado un valor de carga mutacional de 27,7 mutaciones/Mb, siendo el único para el que se ha

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

registrado un valor ≥ a 10 mutaciones/Mb. Estos resultados serían compatibles con la elevada cantidad de mutaciones conductoras detectadas por WGS.

4.4.2. Marcadores inmunitarios: Inestabilidad de microsatélites

En este apartado, se muestran los resultados obtenidos en relación con la estabilidad de microsatélites. Para expresarlos, se ha calculado el MSI score (número de microindels en repeticiones de secuencia simple / Mb), para cada paciente, estableciéndose el umbral de significancia en 0,909. Al igual que en los casos anteriores se ofrece un contexto de la enfermedad de los pacientes con respecto a la MSI extraído de la cohorte control de cada uno.

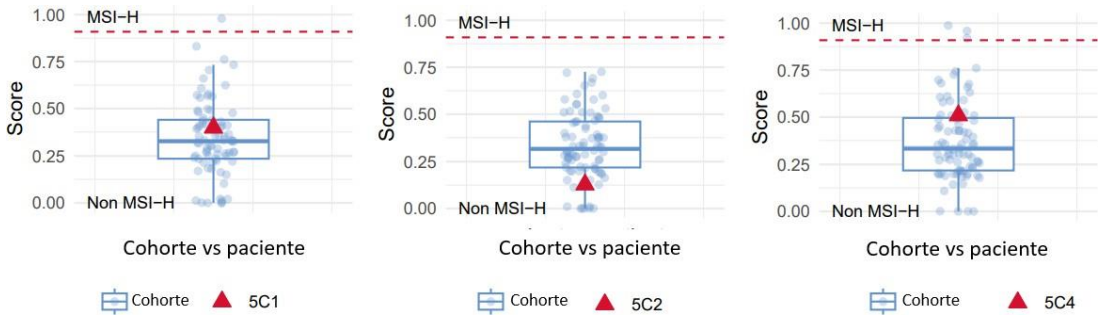


Figura 22. Estatus de MSI en pacientes con adenocarcinoma de CRC

En los pacientes con adenocarcinoma de colon, podemos observar los siguientes scores:

- 5C1: MSI del paciente = 0,4
- 5C2: MSI del paciente = 0,1
- 5C4: MSI del paciente = 0,5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

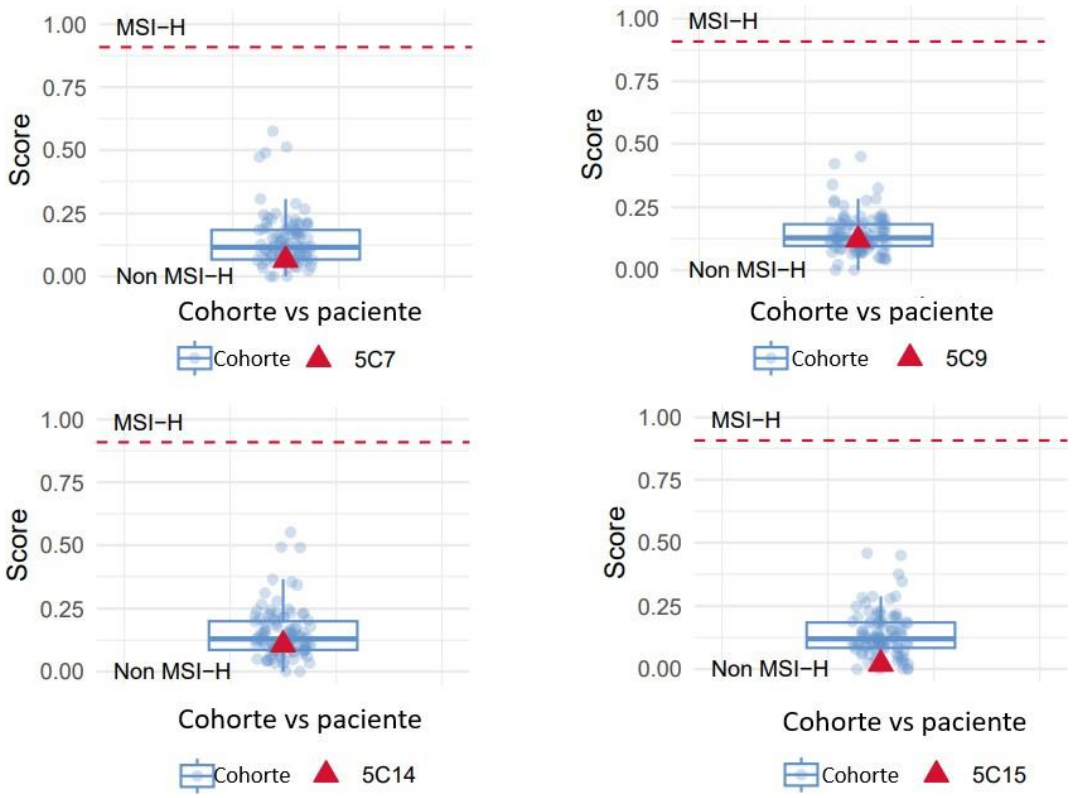


Figura 23. Estatus de MSI en pacientes con adenocarcinoma de pulmón

En los pacientes son adenocarcinoma de pulmón se registraron los siguientes resultados:

- 5C7: MSI del paciente = 0,1
- 5C9: MSI del paciente = 0,1
- 5C14: MSI del paciente = 0,1
- 5C15: MSI del paciente = 0

Los resultados del MSI score de todos los pacientes han sido inferiores al umbral de significación estadístico por lo que se determina que ninguno presenta inestabilidad de microsatélites.

4.4.3. Marcadores inmunitarios: Puntos de control inmunitario

Los siguientes diagramas de caja muestran los valores de expresión de RNA-Seq (transcripciones por millón, TPM) para tejido normal y tumoral de la cohorte control de cada paciente (las diferencias significativas dentro de la cohorte de fondo están marcadas con * junto al símbolo del gen). Los datos específicos del paciente se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

muestran como un triángulo rojo y los cambios de pliegue log2 (FC) del par tumor/normal del paciente se mencionan debajo del símbolo del gen.

Estos datos han sido extraídos del análisis de RNA-seq; el porcentaje de lecturas mapeadas para cada paciente, así como para su cohorte control se presenta a continuación:

Tabla 26. Cobertura de la RNA-seq por paciente

% lecturas mapeadas por RNA-Seq				
Paciente	**Paciente:Tumor**	**Paciente:Normal**	**Cohorte:Tumor**	**Cohorte:Normal**
5C1	79.2	88.5	87.9	87.75
5C2	No disponible	No disponible	88.0	87.8
5C4	79.5	86.6	88.3	88.1
5C7	91.8	No disponible	88.70	88.60
5C9	95.1	88.1	89.25	89.5
5C14	92.6	No disponible	89.60	88.70
5C15	No disponible	No disponible	89.60	89.6

En los pacientes 5C2 y 5C14 no se pudo llevar a cabo este análisis por problemas relacionados con el control de calidad específico para RNA-seq en el tejido tumoral y el tejido sano mientras que en los pacientes 5C7 y 5C14 no se pudo analizar el tejido sano.

En el paciente 5C1 vemos una sobreexpresión de CTLA-4 y PD-L2 de ≈2,44 y ≈1,33 ($p<0,05$) veces superior en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano, aunque ambas expresiones son considerablemente inferiores a la media de la corte control. Por el contrario, la expresión de PD-1 y PDL-1 es ≈0,48 y ≈0,34 ($p<0,05$) veces inferior respectivamente en el tejido tumoral con respecto al tejido normal.

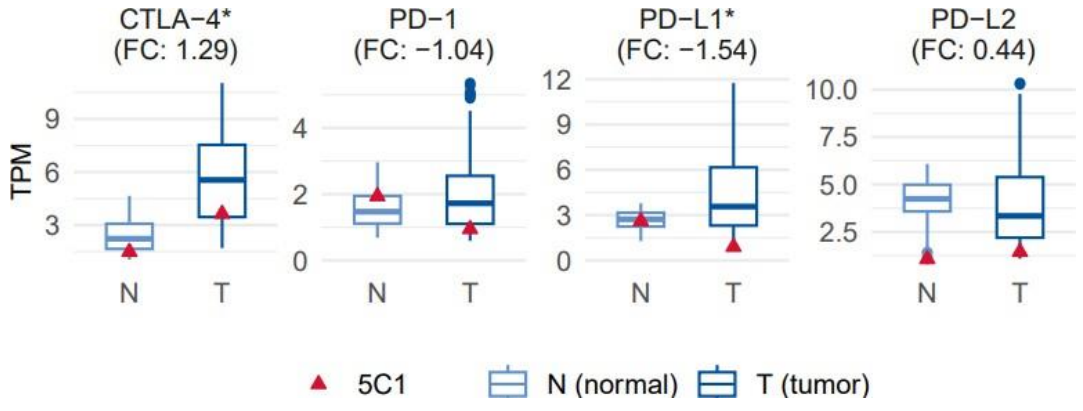


Figura 24. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C1

En el caso del paciente 5C4, se detectó sobreexpresión en todos los puntos de control inmunitario en el tejido tumoral con respecto al tejido normal, destacando especialmente CTLA-4 (≈2.44 $p<0.05$). Cabe destacar que pese a haberse detectado sobreexpresión esta es significativamente inferior a la media de la cohorte en CTLA-4, PD-1 y PD-L1.

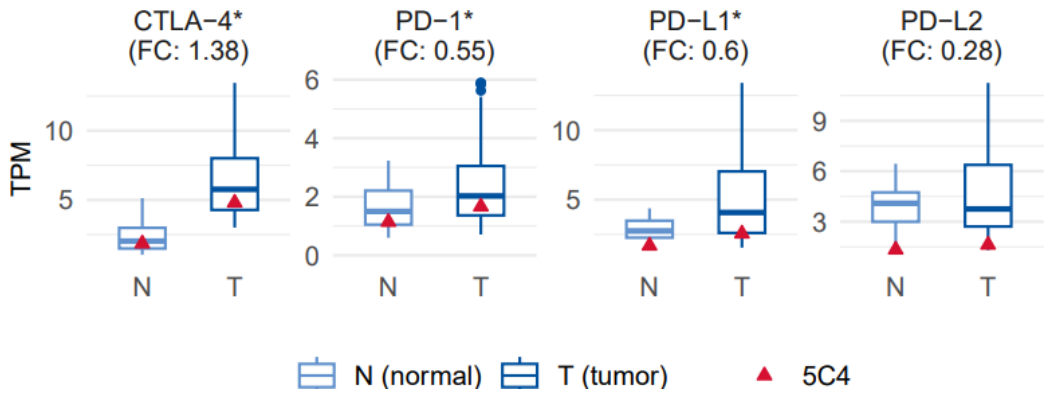


Figura 25. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C4

En el paciente 5C7, aunque no se ha podido calcular el FC, la expresión de todos los marcadores de punto de control inmunitario es ≈0. Estos datos son discordantes en el caso de PD-L1 y PD-L2 donde el FC medio de la corte se sitúa en torno a 7, es decir, la expresión de estos marcadores en el tejido tumoral es muy superior en comparación con el tejido sano en los pacientes que conforman la cohorte control de este paciente.

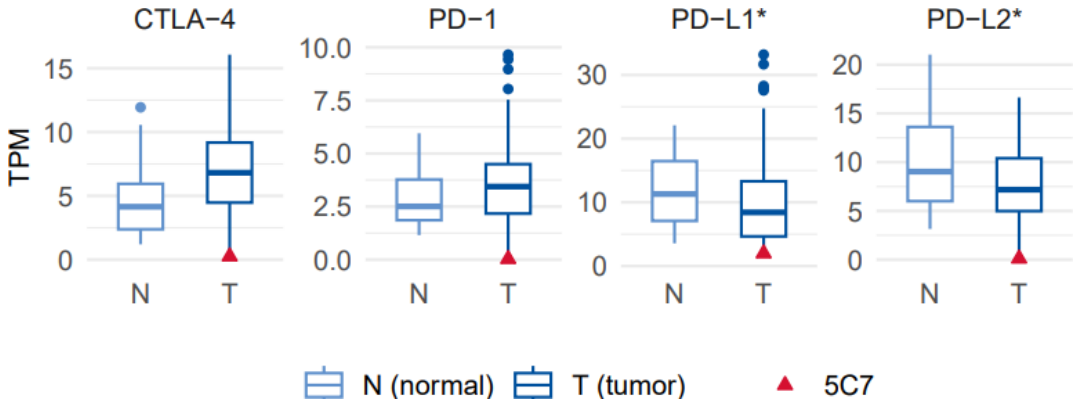


Figura 26. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C7

Con respecto al paciente 5C9 en él se han detectado las mayores sobreexpresiones de los puntos de control inmunitario de todo el análisis. CTDLA-4 presenta una expresión ≈5,3 veces superior en el tejido tumoral con respecto al tejido sano, mientras que PD-1, PD-L1 y PD-L2 lo hacen en ≈3,16; ≈7.94 y ≈1,59 veces respectivamente. Esta sobreexpresión es diferencialmente superior con respecto a la cohorte en CTLA-4, PD-1 y especialmente en PD-L1.

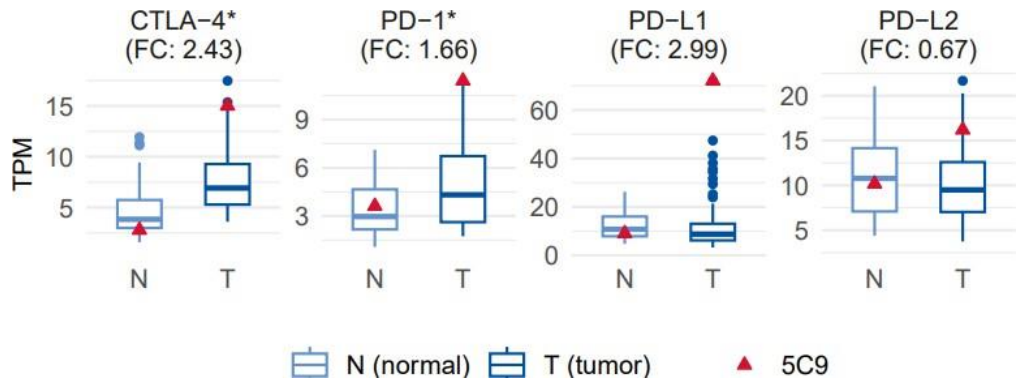


Figura 27. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C9

Finalmente, en el paciente 5C14, aunque no está disponible el FC entre el par tumor/normal se pudo observar sobreexpresión de PD-L1 en el tejido tumoral, contrariamente a lo observado en el resto de los marcadores. En esta ocasión, CTLA-4 y PD-1 se encontraría infraexpresados con respecto a la cohorte control.

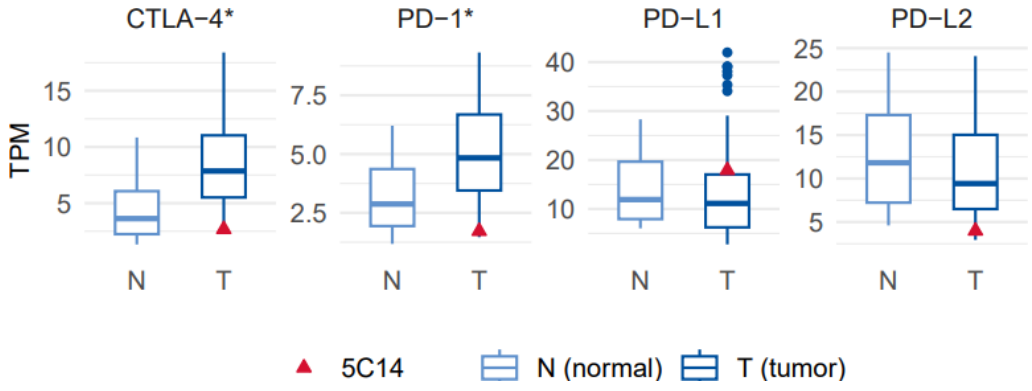


Figura 28. Valores de expresión de los marcadores de punto de control inmunitario en el paciente 5C14

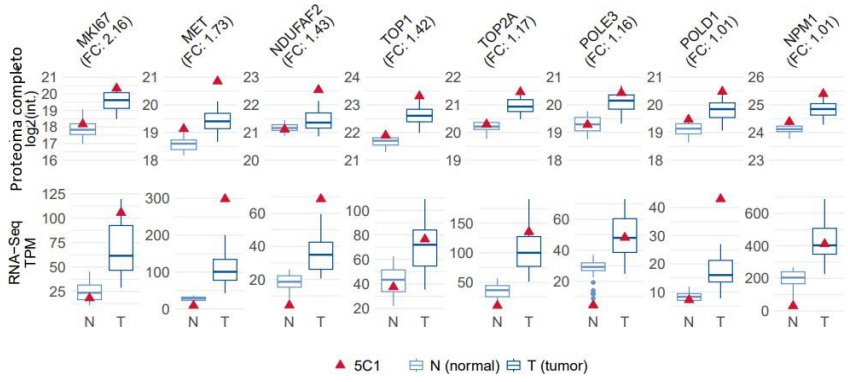
4.5. Proteínas reguladas diferencialmente a partir de dianas farmacológicas conocidas

En este apartado, se muestran las proteínas cuya expresión ha sido diferencialmente significativa con respecto a aquellas que son dianas terapéuticas aprobadas por la FDA (tanto tejido específicas como *off label*), aquellas que están incluidas en la base de datos *Open Target Platform* o aquellas que están implicadas en el desarrollo de ensayos en fase III o superior para la patología de interés. El perfil de expresión de RNA-Seq se agrega para investigar la regulación ascendente o descendente en ambos tipos de análisis.

Tabla 27. Cobertura del análisis del proteoma por paciente

Proteoma - Proteínas medidas				
Paciente	**Paciente:Tumor**	**Paciente:Normal**	**Cohorte:Tumor**	**Cohorte:Normal**
5C1	23783.0	23453.0	23498.0	23256.50
5C2	23093	23579	23511.0	23261
5C4	23711.0	23588.0	23536.0	23311.0
5C7	23466.0	No disponible	23541.50	22798.00
5C9	23786.0	22847.0	23570.50	22906.5
5C14	23388.0	23326	23605.50	22875.00
5C15	23443	23386	23684.50	22977.0

Los datos específicos del paciente se representan mediante un triángulo rojo para dar una indicación de la expresión individual de este en el contexto de la expresión esperadaen esta enfermedad (diagrama de cajas azul). La ausencia del triángulo rojo indica quela molécula no se midió en el paciente de interés. En los gráficos de caja, se representan todas las moléculas que presentan diferencias estadísticamente significativas, ordenadas por cambios logarítmicos decrecientes (log2 *fold changes*, FC) del par tumor/normal del paciente (representados debajo del símbolo del gen).



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 31. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C4

Atendiendo a estos criterios de análisis, encontramos en el paciente 5C1 una sobreexpresión por orden creciente en el tejido tumoral con respecto al tejido normal de las proteínas NPM1 (≈ 2,01), POLD1 (≈2,01), POLES3 (≈2,23), TOP2A (≈2,25), TOP1 (≈2,67), NDUFAF2 (≈2,69), MET (≈3,31) y MKI67 (≈4,46). En este paciente la sobreexpresión de proteínas es correlativa entre los datos obtenidos por análisis proteómicos y RNA-seq.

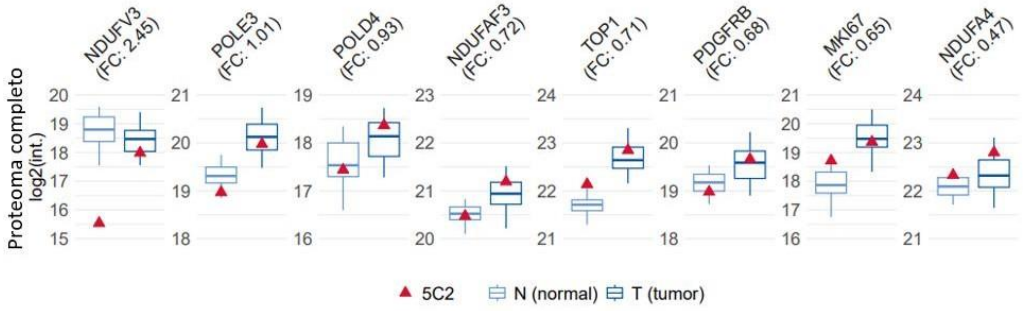
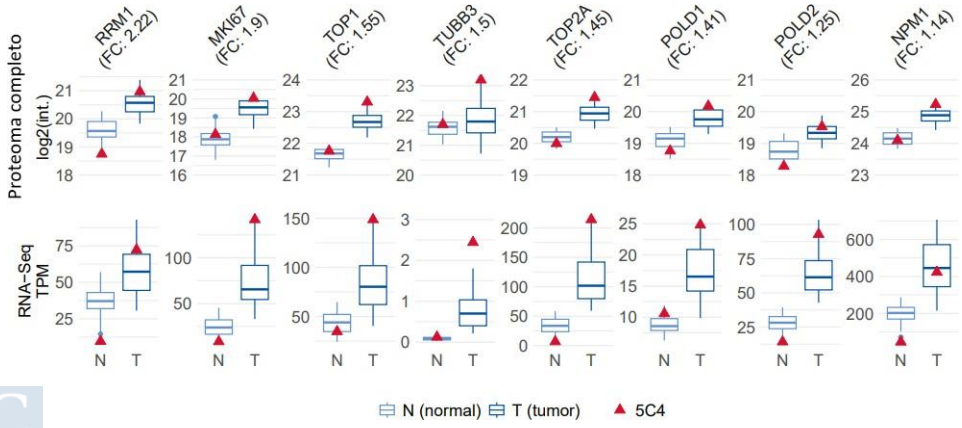


Figura 30. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C2

Si hablamos del paciente 5C2, se detectó una sobreexpresión por orden creciente de las proteínas NDUFA4 (≈1.38), MIKI67 (≈1,56), PDGFRB (≈1.60), TOP1 (≈1,63), NDUFAF3 (≈1,64), POLD4 (≈1.90), POLES3 (≈2.01), NDUFV3 (≈5,46). En esta ocasión los resultados del paciente se ajustan en gran medida a los cuartiles representados por la cohorte por lo que, aunque se carece del perfil de expresión de RNA-seq se considera que las sobreexpresiones detectadas son compatibles con el perfilde resultados esperable en adenocarcinoma de CRC.



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 31. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C4

En el paciente 5C4, se detectó una sobreexpresión de proteínas implicadas en el proceso de trascripción del DNA (NMP1 ≈2,20; POLD2 ≈2,37; POLD1 ≈2,65; TOP2A ≈2,73; TOP1 ≈2.92; RRM1 ≈4,65) así como de proteínas implicadas en la multiplicación y el movimiento celular (TUBB3 ≈2,82 y MIKI67 ≈3,73). En este paciente, la sobreexpresión de estos genes es significativamente mayor a la media de la cohorte en el caso de TUBB3.

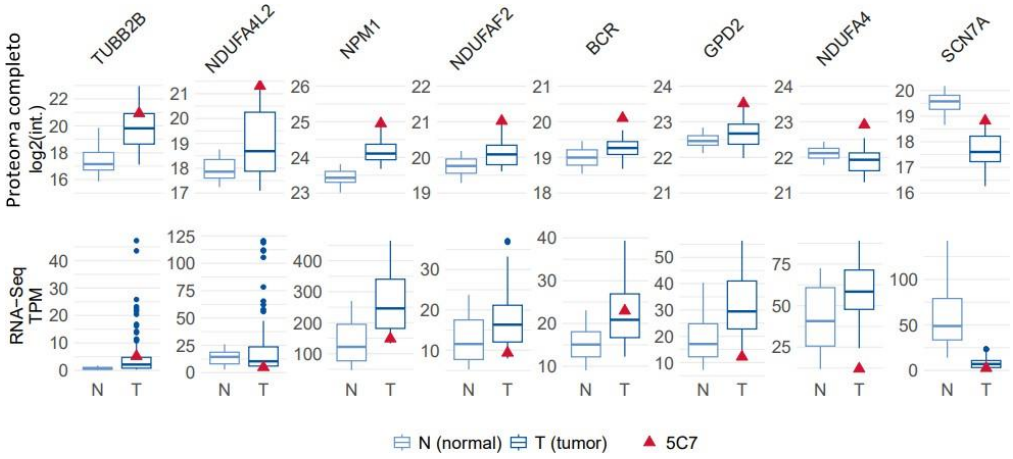


Figura 32. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C7

Pasando a los pacientes con adenocarcinoma de pulmón, en el paciente 5C7 no se pudo analizar el tejido normal ni mediante proteómica ni mediante RNA-seq por problemas en el control de calidad específico para estas técnicas. No obstante, mediante el análisis del tejido tumoral se estableció un perfil de expresión del tumor del paciente que se comparó con su cohorte correspondiente, detectándose una sobreexpresión en las proteínas SCN7A, NDUFA4, GPD2, BCR, NDUFAF2, NPM1, NDUFA4L2 y TUBB2B.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

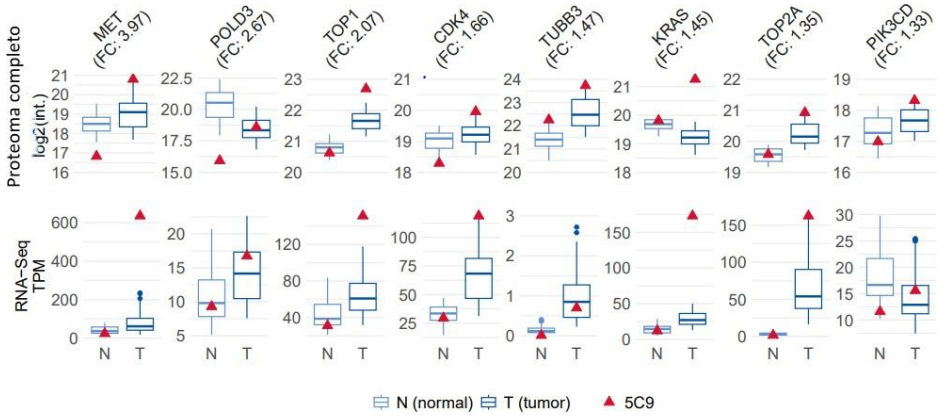


Figura 33. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C9

Continuando con el paciente 5C9, este es en el que en términos generales se ha detectado una mayor sobreexpresión de proteínas. En orden creciente, encontramos sobreexpresadas las proteínas PIK3CD (≈2,51), TOP2A (≈2,54), KRAS (2,73), TUBB3 (≈ 2,77), CDK4 (≈ 3.16), TOP1 (≈4,19), POLD3 (≈6,36) y MET (≈15,67). De entre ellas, destaca especialmente por encima de la cohorte la expresión de KRAS. Asímismo, destaca la baja expresión de MET, POLD3 y CDK4 en el tejido normal en comparación con la cohorte control.

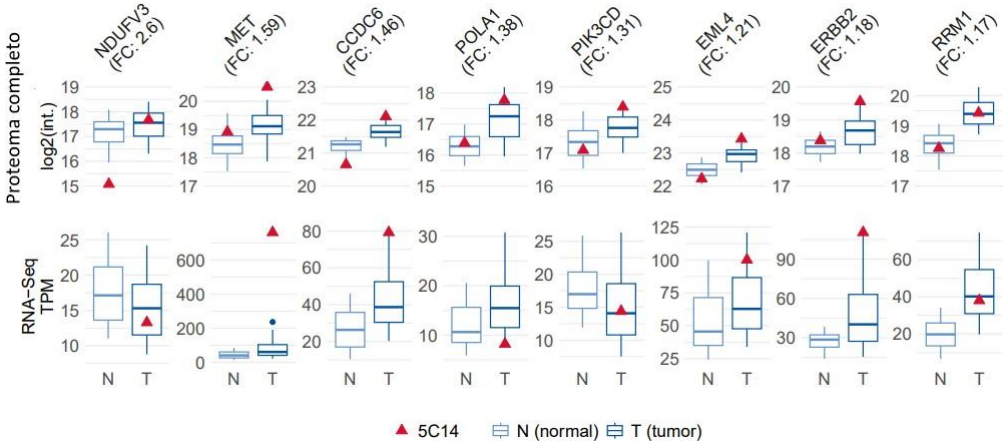


Figura 34. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C14

Por su parte, en el paciente 5C14 se detectó sobreexpresión de las proteínass RRM1, ERBB2, EML4, PIK3CD, POLA1, CCDC6, MET y NDUFV3 en la muestra de tejido tumoral en comparación con la muestra de tejido sano. De entre ellas, destacan

especialmente ERBB2 (≈2,26) y MET (≈3,10). Al comprar con la cohorte control, destaca la baja expresión de NDUFV3 en el tejido sano.

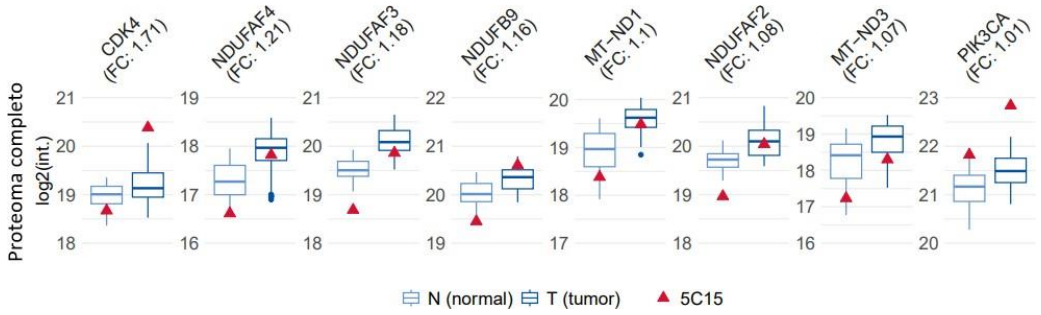


Figura 35. Proteínas con mayor expresión en el proteoma del paciente 5C15

Finalmente, en el paciente 5C15 se evidenció la sobreexpresión de los siguientes genes en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano: PIK3CA (≈2,01), MT-ND3(≈2,09), NDUFAF2 (≈2,11), MT-ND1 (≈2,14), NDUFB9 (≈2,23) NDUFAF3(≈2,26), NDUFAF 4(≈ 2,31) y CDK4 (≈3,27). En comparación con lacohorte control, destaca la baja expresión de todos los genes a excepción de PIK3CA enel tejido sano, así como la sobreexpresión de los genes PIK3CA y CDK4.

4.5.1. Fosforilaciones dentro de las proteínas con mayor expresión

En este apartado se muestran los resultados referentes a la localización de los lugares de fosforilación de las proteínas que han presentado mayor expresión comentadas en el apartado anterior, representados con triángulos rojos para el paciente de interés y con círculos azules para la cohorte. La fosforilación de la proteína en la gráfica se indica según la posición dentro de la secuencia de aminoácidos en la que haya ocurrido, así como del residuo del aminoácido que se ha fosforilado (S = serina, T = treonina, Y = tirosina).

Tabla 28. Cobertura del análisis del fosfoproteoma por paciente

Proteoma - Proteínas medidas				
Paciente	**Paciente:Tumor**	**Paciente:Normal**	**Cohorte:Tumor**	**Cohorte:Normal**
5C1	71707.0	74687.0	74152.0	74559.00
5C2	72355	73227	74832.0	74318.0
5C4	74927.0	73688.0	74441.0	74058.5
5C7	77247.0	No disponible	77554.50	76001.50
5C9	79024.0	79792.0	78685.50	76727.0
5C14	77746.0	73523	77487.50	75595.00
5C15	73522	78556	77898.00	76564.0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estos resultados se expresan según el cambio logarítmico (log2FC) entre el tejido tumoral y el tejido sano en cada paciente. El lugar con el log2 FC absoluto mayor aparece marcado con una estrella (roja= paciente, azul= cohorte). Un log2FC superior a 1 significa regulación positiva del proceso de transcripción génica, mientras que un log2FC inferior a -1 significa regulación negativa en el tumor en comparación con el tejido normal.

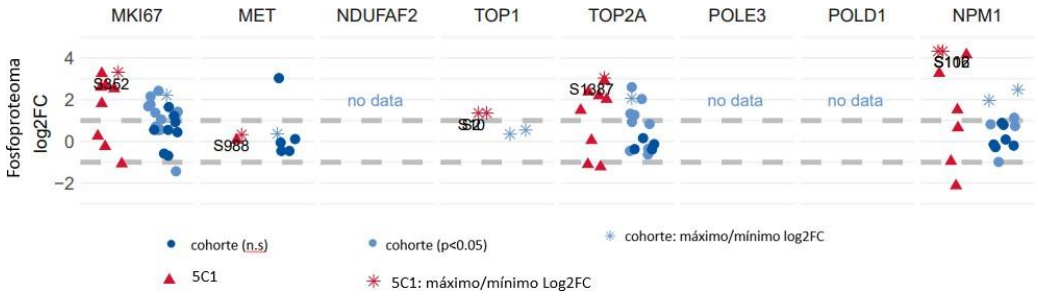


Figura 36. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C1

En el paciente 5C1 se detectaron puntos de fosforilación en la secuencia de las proteínas MIK67, MET, TOP1, TOP2A y NPM1. En MIK67 el lugar de fosforilación con mayor cambio de pliegue entre el tejido tumoral y el tejido normal se encuentra en la posición 352, en MET lo hace en la 988, en TOP1 en la 120, en TOP2A en la 1387 y en NPM1 lo hace en las posiciones 102 y 16 siendo el residuo del aminoácido fosforilado en todas ellos la serina.

El resultado de la fosforilación de estas proteínas dará lugar a la expresión de los genes MIK67, TOP1, TOP2A y NMP1. Contrariamente, la fosforilación encontrada en MET ejercerá un control negativo sobre la transcripción de este gen.

En comparación con la cohorte control, el perfil del paciente sigue una tendencia similar a la cohorte presentando un cambio de plano (FC) entre el tejido tumoral y el tejido normal ligeramente mayor especialmente en NPM1

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

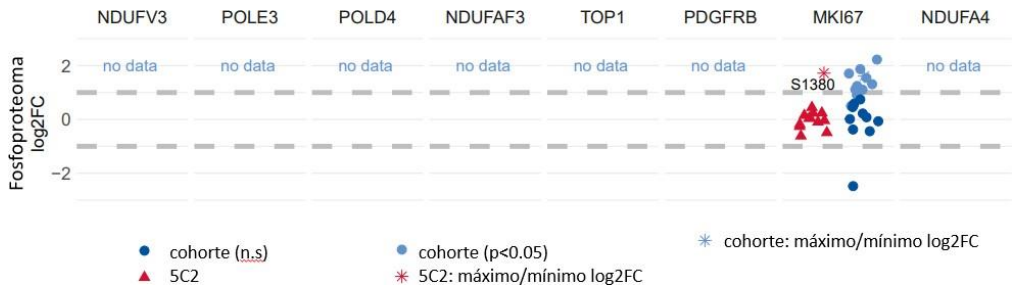


Figura 37. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C2

En el paciente 5C2 solamente se encontraron puntos de fosforilación en la proteína MKI67 situándose el FC máximo en la posición 1380 igual que en la cohorte control y siendo el residuo del aminoácido fosforilado la serina. Esta fosforilación dará lugar a la expresión del gen.

La distribución de estos puntos de fosforilación entre el paciente y la cohorte es homogénea, no destacando el perfil del paciente de interés entre la cohorte control.

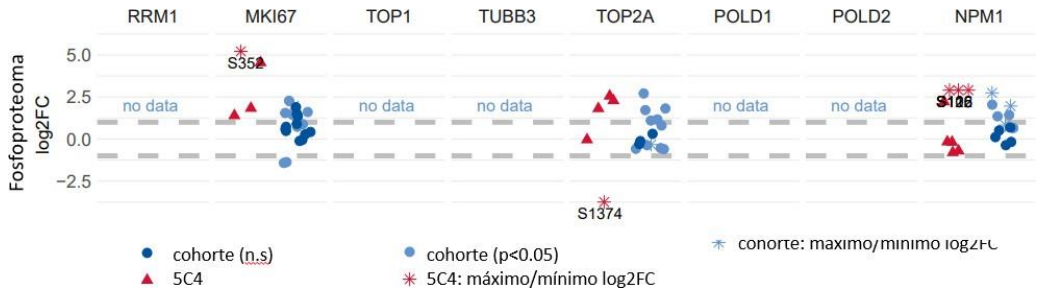


Figura 38. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C4

Siguiendo por el paciente 5C4, se detectó fosforilación en las proteínas MKI67, TOP2A y NPM1. En MIK67 el máximo FC se encontró en la posición 352, en TOP2A en la 1372 y en NMP1 en las posiciones 12, 22 y 106. En todas ellas, el resido de fosforilación es la serina.

En este paciente, el efecto biológico de la fosforilación de las proteínas mencionadas será la expresión de los genes *MKI67* y *NPM1* y la inhibición de la actividad del gen *TOP2A.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

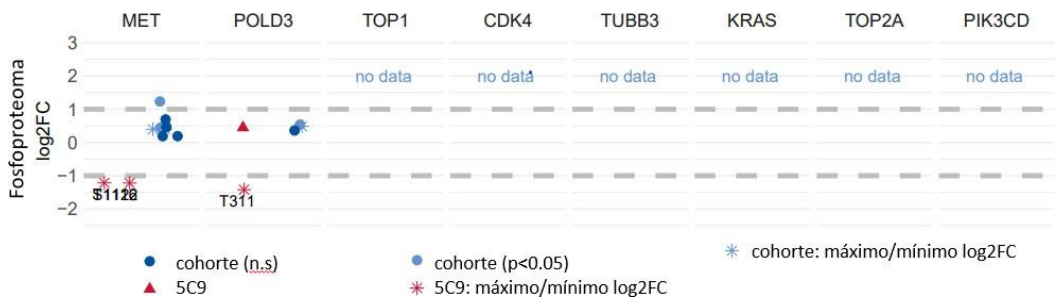


Figura 39. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C9

Continuando con el paciente 5C9, se detectaron puntos de fosforilación en 2 de las 8 proteínas analizadas con mayor expresión. En primer lugar, encontramos en la proteína MET cuyos FC con mayor significación estadística se sitúan en las posiciones 12 (treonina) y 1126 (serina). En segundo lugar, encontramos la proteína POLD3 con FC significativo en la posición 311 (treonina).

En ambos casos el resultado biológico de estas fosforilaciones es la inhibición de la expresión de estos genes. Característicamente, la aparición de fosforilación en estas proteínas no es un evento identificativo de la cohorte control.

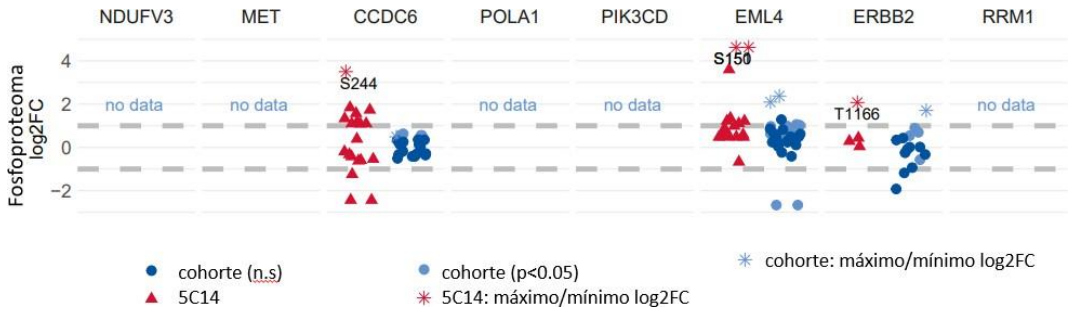


Figura 40. Puntos de fosforilación en las proteínas con mayor expresión del paciente 5C14

Por su parte, en el paciente 5C14 se encontró fosforilación en las proteínas CCDC6, EMIL4 y ERBB2. En esta ocasión, la FC máxima se encontró en la posición 244 (S) en CCDC6, en las posiciones 1 (S) y 150 (S) en EML4 y en la posición 1166 (T) en ERBB2. La fosforilación de estas proteínas da lugar en este caso a la regulación positiva del proceso de transcripción del gen, es decir, favorece la expresión de estos genes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, cabe mencionar que ni en el paciente 5C7 ni en el 5C15 se detectó fosforilación en ninguna de las proteínas que presentaron mayor expresión para cada paciente.

4.6. Resultados de los análisis mutacionales analizados sobre el tejido en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

Sobre la muestra de tejido tumoral obtenida de la cirugía de los pacientes participantes se realizaron los siguientes análisis para determinar el estatus mutacional del tumor:

- 5C1: no se realizaron análisis
- 5C2, 5C4 y 5C15: IHC para las proteínas de los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2
- 5C7: IHC para las proteínas de ALK y ROS1; IHC para la expresión de PD-L1; PCR en tiempo real para mutaciones de EGFR, BRAF y NRAS
- 5C9 y 5C14: IHC para las proteínas de ALK y ROS1; IHC para la expresión de PD-L1; PCR en tiempo real para mutaciones de EGFR, BRAF y NRAS, NGS

Tras la realización de los estudios anteriormente mencionados se determinó que los pacientes 5C2, 5C4 y 5C15 presentaban un sistema de reparación de errores del DNA con función conservada.

Por otra parte, en el paciente 5C7 no se detectó ninguna mutación, mientras que en los pacientes 5C9 y 5C14 si se detectaron.

En el paciente 5C9 se detectaron mutaciones en STK11 (p.Asp194Ans; VAF 0.23%) y TP53 (p. Arg248Leu; VAF 0.122%) así como una sobreexpresión de PD-L1 (95%). La primera de estas mutaciones se ha identificado como como una variante genómica potencialmente oncogénica y un posible marcador de respuesta al tratamiento con bemcentinib en combinación con pembrolizumab. La segunda de estas mutaciones, también se ha identificado como potencialmente oncogénica y aunque es reconocida por la FDA como biomarcador pronóstico en numerosos tumores líquidos su valor como biomarcador en adenocarcinoma de pulmón es aún desconocido.

Por otra parte, en el caso de la paciente 5C14 se identificaron dos mutaciones, una en KRAS (p.Gly12Cys, VAF 25%) y otra en BRCA2 (p.Gln421*; VAF 2.4%) así como una sobreexpresión de PDL-1 (20%). La mutación KRAS G12C es accionadle, y actualmente dos fármacos han demostrado actividad en pacientes con cáncer de pulmón

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y esta alteración, sotorasib y adagrasib. En el caso de la mutación presentada en BRCA2 cabe destacar que esta es una mutación potencialmente oncogénica considerada un biomarcador de respuesta a varios fármacos aprobados por la FDA para otro tipo de tumor.

4.7. Análisis de la supervivencia libre de progresión y supervivencia global a los dos años

En este apartado se muestran los resultados relativos a la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) a lo largo del periodo de seguimiento realizado a los pacientes desde el primer mes tras la cirugía hasta los 24 meses tras la misma.

En lo que respecta a la supervivencia libre de progresión se obtuvo un porcentaje del 100% hasta el mes 12, en el que la SLP cae al 85,7% (IC 95%) tras el registro de la progresión de la enfermedad de la paciente 5C14 (ver Figura 41). La media de SLP se situó en 22,2 meses y la mediana en 24 meses.

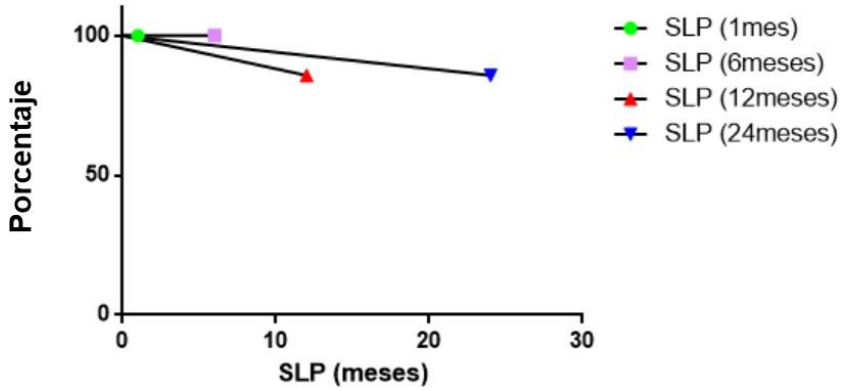


Figura 41. Supervivencia libre de progresión (SLP) de todos los participantes a lo largo de los distintos seguimientos

Por su parte, la supervivencia global a lo largo de todo el periodo de seguimiento realizado a los pacientes se situó en el 100% no habiéndose registrado ningún fallecimiento (ver Figura 42) en la fecha del último corte de datos, si bien como se ha señalado previamente una de las pacientes con cáncer de pulmón falleció en abril 23 trasprogresión tumoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

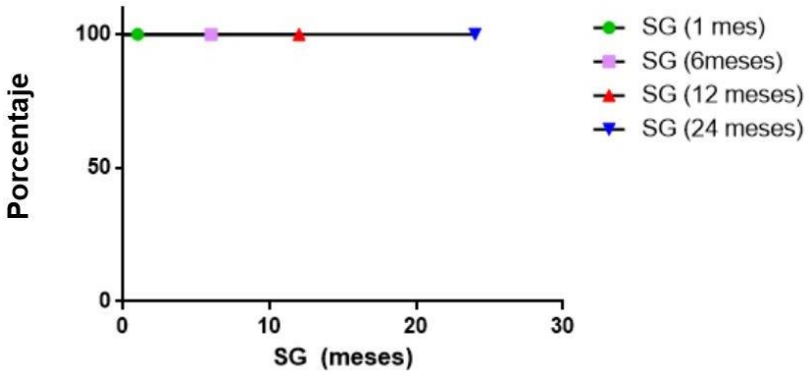


Figura 42. Supervivencia global (SG) de todos los participantes a lo largo de los distintos seguimientos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Discusión

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 5: Discusión

El adenocarcinoma de pulmón, así como el adenocarcinoma colorrectal representan la subcategoría histológica más diagnosticada dentro de los tumores malignos de origen pulmonar y colorrectal respectivamente, siendo a su vez los tipos de tumores con mayor incidencia y prevalencia a nivel global. A pesar de los excelentes resultados terapéuticos obtenidos mediante cirugía y/o radioterapia radical en estadios tempranos aproximadamente un 50% de los pacientes diagnosticado con alguno de estos tumores sufrirá una recaída a los 5 años del diagnóstico inicial.

Una vez la enfermedad es diagnosticada en fase metastásica o en aquellos casos en los que la enfermedad no sea resecable, la quimioterapia se convierte en el tratamiento principal aprobado por los diferentes organismos reguladores. Aunque la quimioterapia ha supuesto un gran impacto en el aumento de la supervivencia de estos pacientes, en un gran porcentaje de ellos termina perdiendo efectividad o bien el paciente desarrolla resistencia al tratamiento, habiéndose demostrado en los últimos años la importancia de conocer en profundidad las características comportamentales del tumor, así como la farmacocinética y farmacodinámica de los distintos fármacos para poder sobreponerse a estas limitaciones.

Atendiendo a la práctica clínica habitual los elementos que determinan el pronóstico, así como el inicio y fin de una terapia en particular son: las características clinicopatológicas, la evaluación radiológica y el CEA sérico. Aunque estos parámetros proporcionan información valiosa sobre la extensión del tumor o son herramientas útiles para monitorizar el comportamiento de este, ninguna de ellas es una herramienta con la potencia suficiente para inferir la evolución del tumor, la respuesta al tratamiento o la aparición de resistencia farmacológica y por tanto todas ellas presentan limitaciones para conocer con precisión el pronóstico del paciente.

El análisis de las muestras tumorales a través de técnicas multiómicas (permite entender las relaciones entre los diferentes niveles moleculares), ha permitido conocer en mayor profundidad la arquitectura molecular del tumor, así como el comportamiento de las biomoléculas que lo desarrollan, conforman y sustentan. Estos avances han permitido conocer mejor los mecanismos de resistencia farmacológica y así diseñar fármacos

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dirigidos que mejoran la SLP y SG significativamente en comparación con el tratamiento estándar tal y como se ha descrito en el apartado 3.1 y 3.2 del capítulo 1.

En este apartado, se proporciona una comparación entre los resultados obtenidos a través de las diferentes técnicas multiómicas empleadas (genómica, transcriptómica, proteómica y fosfoproteómica) en primer lugar para cada paciente, seguidamente entre pacientes que presentan la misma patología y finalmente entre los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de colon y adenocarcinoma de pulmón.

Comenzando por el paciente 5C1, las amplificaciones de *CDK6* y *FLT1* detectadas por WGS pueden tener un papel crucial en la regulación de la progresión del ciclo celular en el adenocarcinoma de colon, así como en la angiogénesis tumoral, siendo ambos un factor de mal pronóstico, como se ha sugerido en los estudios de Tadesse et al. (2015), en el caso de *CDK6* y Rezaei et al. (2019) en el caso de *FLT1* (280,281,282,283)

Los estudios preclínicos realizados por Saunders et al. (2021), revelaron cambios significativos en el microambiente tumoral como resultado de la sobreexpresión de *CSF3R*. Estos cambios se asociaron a la activación de diversas vías reguladoras, incluyendo las que afectan a las células T, los macrófagos y ERK/MAPK. Estas alteraciones en última instancia condujeron a un aumento en la infiltración neoantigénica y, como resultado, a una respuesta inmunitaria más pronunciada. Curiosamente, pese a haberse detectado sobreexpresión en este gen no se detectó expresión estadísticamente significativa de ninguna de las dianas para las que existen fármacos de punto de control inmunitario (ver capítulo 4 apartado 4.4.3). Una explicación posible es que esta sobreexpresión pueda favorecer la repuesta al tratamiento con inmunoterapia en presencia o ausencia de positividad para las dianas terapéuticas de punto de control inmunitario conocidas. (284)

En lo que respecta a la amplificación de *FLT3* se desconoce el efecto biológico en pacientes con adenocarcinoma de CRC, aunque los estudios de Lim et al. (2017) y Hasegawa et al. (2021) entre otros han demostrado la baja efectividad del inhibidor de *FLT3* regorafenib tanto *in vitro* como clínicamente. La amplificación de *FLT3* se ha relacionado con una peor supervivencia global, poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar fármacos dirigido hacia esta diana. (285,286)

USC DE COMPOSTELA

Por otra parte, en lo que respecta a las deleciones encontradas en el paciente 5C1 se registraron las siguientes: *MTOR, PIK3CD y PIK3R1*. En el caso de *MTOR* y *PIK3CD*

se desconoce la implicación biológica de su deleción en el adenocarcinoma de CRC. Wang et al. (2022) describió un aumento de células TCD4+ y una disminución de células Treg, TCD8+, neutrófilos y células dendríticas en el microambiente tumoral en presencia de la deleción de *MTOR*. Aunque estas características darían lugar a pensar en un microambiente desfavorable para el tratamiento con inmunoterapia, el estudio de Tayet al. (2020) demostró que la presencia aumentada de TCD4+ cursa con un mejor mantenimiento a largo plazo de la respuesta inmune, así como la capacidad de responder contra epítopos autoderivados independientemente de la repuesta de las Treg. (287,288)

Las deleciones de *PIK3R1* se han relacionado con la pérdida de función del gen y por tanto con la sobreactivación de esta vía, que en último término da lugar a la activación aberrante de la vía de señalización AKT-mTOR. La activación aberrante de esta vía dará lugar a una replicación celular incontrolada. (289,290)

En este paciente, cabe destacar que el exposoma es negativo para todos los factores de riesgo de cáncer de CRC por lo que para aquellas amplificaciones y deleciones encontradas cuyo significado biológico es incierto, cabría pensar que estas pueden ser debidas en mayor medida a estímulos endógenos.

Continuando con el análisis de resultados, los datos obtenidos referentes a la inestabilidad de microsatélites serían los esperables al no haberse encontrado una alta carga mutacional tumoral (TMB). Estos datos se corresponderían con la literatura, pues es esperable no detectar inestabilidad de microsatélites en hasta en un 85% de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de CRC. Esta baja carga mutacional juntocon la falta de expresión los marcadores de punto de control inmunitario serían indicativo de que el paciente no es el candidato ideal para recibir tratamiento con inmunoterapia. Así mismo, el bajo TMB también explicaría la nula contribución a ninguna firma mutacional.

Respecto al análisis del proteoma la expresión elevada de las proteínas fosforiladas (mayor probabilidad de ser una proteína aberrante) producidas por los genes *MIK67* y *MET* cursarían con un aumento en la multiplicación celular. Ambos son marcadores potenciales de progresión, y se asocian a una baja supervivencia libre de progresión y supervivencia global. (291,292)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Así mismo, la proteína fosforilada TOP2A se ha relacionado con progresión de la enfermedad y resistencia a la quimioterapia mediada por la inhibición de la apoptosis celular. La proteína fosforilada NPM1 ejerce la función de promotor de la proliferación celular, y al igual que TOP2A se relaciona con un peor pronóstico. (293,294)

En lo que respecta a las proteínas con expresión elevada, pero no fosforiladas, NDUFAF2 está implicada en la proliferación celular, mientras que POLES3 y POLD1se han relacionado con la oligopoliposis y el cáncer hereditario lo que cuadraría con el hallazgo de 4 genes hereditarios mutados en la paciente y el exposoma negativo. Finalmente, TOP1 se ha descrito en la literatura como un marcador de buena respuestaal tratamiento con irinotecan. (295, 296)

A modo de resumen, el análisis multiómico nos informa sobre el potencial efecto terapéutico positivo mediante el tratamiento con un inhibidor de CDK6, irinotecán o incluso inmunoterapia con fármacos de punto de control inmunitario, así como de posibles resistencias al tratamiento con quimioterapia o baja efectividad del tratamiento con regorafenib.

En esta paciente, no se realizaron análisis moleculares por práctica clínica habitual por lo que los análisis multiómicos del proyecto son los que nos proporcionan toda la información sobre la arquitectura y comportamiento de este tumor. Tras la cirugía, la paciente recibió adyuvancia con quimioterapia bajo el esquema CAPOX y se encuentra libre de recidiva. De producirse progresión en el futuro sería aconsejable orientar el tratamiento en función de los resultados moleculares obtenidos.

En el paciente 5C2 se detectó la variación somática en BRAF D594E, potencialmente oncogénica en adenocarcinoma de CRC. Esta variante es más frecuente en mieloma, melanoma y NSCLC da lugar a la activación de la vía de señalización celular MAPK mediante CRAF. Aunque su función en CRC no es aún clara, estudios realizados en melanomas y células HEK293 han puesto de manifiesto que esta mutación es resistente al tratamiento con dabrafenib, mediado por el aumento de la activación de la vía MAPK tras el tratamiento, mientras que por el contrario es sensible al tratamiento con trametinib. Así mismo, como esta mutación genera quinasas carentes de capacidad de autofosforilación o catalización de la fosforilación de proteínas, se sugiere que podría ser sensible al tratamiento con vemurafenib. (297,298,299) Estos tratamientos no están

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

actualmente aprobados por la FDA para el tratamiento de CRC, pero sí son accesibles para esta patología a través de un ensayo clínico (ver capítulo 4, apartado 4.3.1).

El CSF3R, un receptor transmembrana, está frecuentemente mutado en la leucemia neutrofílica crónica y en la leucemia mieloide crónica atípica. El gen *CSF3R* interviene en la modificación del microambiente tumoral en pro de provocar una respuesta inmune antitumoral mayor tal y como se ha descrito para el paciente 5C1. El significadobiológico de la mutación somática *CSF3R P272L* es desconocido en CRC y otros tumores.

Con respecto a las 3 mutaciones germinales detectadas, aunque sería altamente recomendable realizar análisis dirigidos, el exposoma del paciente refleja presencia de factores de riesgo para el desarrollo de CRC tales como obesidad, hábito tabáquico, hábito enólico, consumo de carne elevado, sedentarismo o diabetes, por lo que contamos con indicios suficientes para pensar que estamos ante un tumor esporádico.

En este caso, el TMB registrado en el paciente fue bajo, por lo que igual que ocurría con el paciente 5C1 es esperable un resultado negativo para la inestabilidad de microsatélites, así como para la contribución a las firmas mutacionales.

En lo que respecta al proteoma, se registró al igual que en el paciente 5C1 un aumento de la expresión de proteínas derivadas de los genes *MKI67* (fosforilada), *TOP1 yPOLES3* cuya implicación en CRC ya se ha descrito previamente. Así mismo, seencontraron sobreexpresadas proteínas de la familia POLD y NDUFA, en este caso POLD4, NDUFAF3 y NDUFA4. Estudios como el de Fuchs et al. (2021) han evidenciado en cultivo celular que el aumento de POLD4 está directamente relacionado con la síntesis de DNA y la progresión del ciclo celular en presencia de estrés replicativo inducido por la activación de oncogenes.

Por su parte, NDUFAF3 es uno de los factores de ensamblaje del complejo NADH implicado en la regulación del ciclo celular, por lo que un aumento de su expresión dará lugar a una replicación descontrolada. En cuanto a NDUFA4, estaría implicado en la proliferación celular y la transición epitelio mesenquimal. (300, 301)

Finalmente, se registró sobreexpresión de PDGFRB y de NDUFV3, siendo esta última la más sobreexpresada de todas las proteínas estudiadas. La sobreexpresión de PDGFRB estaría implicada en la angiogénesis tumoral, la invasión y metástasis celular

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y por ende se convierte en un factor predictor de mal pronóstico. Por su parte, NDUFV3 es una de las más de 40 enzimas que forman el complejo NADH implicado en la regulación del ciclo celular por lo que, aunque la función concreta de esta enzima no se conoce valores aumentados estarían relacionados con una replicación celular aberrante. (302,303)

En resumen, los datos obtenidos a través de los análisis multiómicos nos sitúan ante un paciente con un tumor potencialmente esporádico que presenta dos mutaciones somáticas una de ellas oncogénica con potencial sensibilidad al tratamiento con trametinib, vemurafenib y quimioterápicos que actúen sobre las distintas fases del ciclo celular. Así mismo, a través de estos datos podemos inferir una baja efectividad terapéutica al tratamiento con dabrafenib e inmunoterapia.

Por práctica clínica habitual solamente se estudió el estatus mutacional en los genes implicados en el sistema de reparación de errores del DNA obteniéndose resultados negativos, es decir, estabilidad de microsatélites. Comparando estos datos con los obtenidos por análisis multiómicos estos últimos si proporcionaron información acerca de qué tratamientos podían resultar más eficaces, así como aquellos con poca probabilidad de respuesta.

Tras la cirugía, el paciente no recibió tratamiento ni ha presentado recurrencia en el momento en el que se escribe este texto, por lo que en caso de aparecer recurrencia en el futuro se recomienda valorar tratamiento con alguno de los fármacos potencialmente beneficiosos descritos anteriormente.

Pasando al paciente 5C4 y último del grupo de pacientes con adenocarcinoma de CRC, la mutación somática detectada en *RET D1031N* ha sido catalogada como muy poco frecuente en tumores que no sean tiroideos o NSCLC. Su función biológica en cáncer de CRC no está validada, aunque sí se conoce que aquellas mutaciones que provocan la pérdida de función de este gen dan lugar a la formación de tumores en el colon, siendo por tanto esta mutación un posible indicio de mal pronóstico. (304)

También, se detectó una amplificación de *TOP1* cuya implicación biológica en cáncer de CRC tampoco está totalmente esclarecida. Estudios *in vivo* han demostrado que la sobreexpresión de *TOP1* está directamente relacionada con la hipersensibilidad a los agentes causantes del daño en el DNA, por lo que podríamos decir que esta sobreexpresión podría ser una consecuencia de la mutación de *RET*. Así mismo, en el

USC DE COMPOSTELA

estudio llevado a cabo por Palshof et al. (2017) se demostró una mejor respuesta al tratamiento con irinotecán en pacientes con CRC metastásico con sobreexpresión de *TOP1*, siendo en este caso un marcador de buena respuesta. (305,306)

En cuanto a la detección de mutaciones potencialmente heredables, solamente se detectaron anomalías en 1 de los 11 genes analizados. Pese a que, igual que en los otros casos es recomendable profundizar en este análisis, el exposoma de este paciente refleja factores de riesgo como el sobrepeso, el sedentarismo, el hábito tabáquico y enólico, o la DM2 entre otros con potencial demostrado suficiente para poder sugerir que nos encontramos ante un tumor originado por factores exógenos.

En este caso, el TMB es más elevado que en los otros pacientes con adenocarcinoma de CRC y aunque no llega al nivel de significación necesario para presentar inestabilidad de microsatélites si han sido suficientes para presentar contribución a la firma mutacional *RefSig 18*, por lo que sería valorable ampliar la investigación en dirección a evaluar el grado de relación de la mutación conductora hallada en *RET* no anteriormenterelacionada con la firma. En esta ocasión no se han expresado marcadores de punto de control inmunitario, aunque el microambiente tumoral favorecería la respuesta inmune.

En cuanto al proteoma, se detectó sobre expresión igual que en los 5C1 y 5C2 en las proteínas MKI67 (fosforilada), TOP1, TOP2A (fosforilada), POLD1y NMP1 (fosforilada) cuya relación con el adenocarcinoma de CRC ya ha sido explicada anteriormente. A parte de estas, se detectaron 3 nuevas proteínas sobreexpresadas:RRM1, TUBB3 y POLD2.

Por un lado, la literatura científica indica que niveles elevados de RRM1, una enzima esencial en la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, están relacionados directamente con el desarrollo de la fase S de la replicación celular. Por otro lado, se ha observado que la β-tubulina TUBB3, imprescindible para la heterodimerización y ensamblaje de microtúbulos, desempeña un papel crucial en la correcta división celular. La presencia aumentada de RRM1 y TUBB3 se ha asociado directamente con la represión de la apoptosis y la aparición de metástasis, especialmente en el hígado. Por otra parte, POLD2 presenta una función similar a POLD4 siendo los efectos de su sobreexpresión los ya presentados en el paciente 5C2. (307,308,309,310)

USC

Por práctica clínica habitual, solamente se testó el estatus de inestabilidad de microsatélites, obteniéndose el mismo resultado que mediante técnicas multiómicas. En

este caso, cabe destacar que los análisis multiómicos detectaron una mutación y una amplificación somática relevante al ser sensibles al tratamiento con irinotecán. Sin embargo, estas técnicas no aportaron información sobre posibles resistencias farmacológica, aspecto de interés en un paciente con un estadio tumoral más avanzado y por tanto con una mayor probabilidad de recaída y necesidad de un tratamiento dirigido.

Tras la cirugía, el paciente recibió quimioterapia adyuvante bajo el esquema CAPOX logrando mantenerse sin recidiva hasta la presente fecha. Aunque no se han encontrado indicios que contraindiquen el tratamiento con quimioterapia si sería recomendable en caso de recurrencia valorar el tratamiento con irinotecán o algún inhibidor no específico de *RET*.

Si comparamos el perfil obtenido para los 3 pacientes con adenocarcinoma de CRC podemos decir que todos ellos presentan una carga mutacional baja, no presentan inestabilidad de microsatélites, no expresan ningún marcador de punto de control inmunitario, no comparten mutaciones conductoras y en todos ellos se presenta una sobreexpresión de las proteínas MKI67, TOP1 y alguna de las variables pertenecientes a las familias POLD, POLE y NDUFA.

En términos generales, nos encontramos ante un perfil de paciente con adenocarcinoma de CRC con alteraciones moleculares principalmente relacionadas con el correcto desarrollo de la división celular con una supervivencia libre de progresión y supervivencia global comprometida. Así mismo, en conjunto estos pacientes no serían los candidatos idóneos a recibir tratamiento con inmunoterapia, hecho que también nos pondría ante una esperanza de vida menor, aunque si tendrían predisposición a presentar una buena respuesta ante el tratamiento con irinotecán.

En conclusión, podemos decir que los análisis moleculares llevados a cabo actualmente por práctica clínica habitual limitan considerablemente el conocimiento de laarquitectura y comportamiento del tumor en este tipo de pacientes, dejando de lado posibles opciones terapéuticas beneficiosas para los mismos. No obstante, los datos obtenidos de los análisis multiómicos todavía no nos han permitido establecer relaciones directas entre los niveles de expresión del proteoma y la expresión de genes conductores, amplificación o deleción génica, que permitan un tratamiento completamente individualizado en pacientes con adenocarcinoma de colon.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Continuando el análisis con el grupo de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón, se registraron dos mutaciones conductoras en el paciente 5C7, una en *KRAS Q61H* y otra en *NTRK3 E561stop*. Las mutaciones oncogénicas del codón 61 de *KRAS* suponen un aumento de la afinidad por RAF en comparación con PI3K, dando lugar a una señalización aumentada en la vía MAPK. Por este motivo, las células que presentan esta mutación han demostrado mayor sensibilidad al tratamiento con inhibidores deRAF y MEK (trametinib, cobimetinib y binimetinib) tanto individual como conjuntamente, convirtiéndose por tanto esta mutación y las funcionalmente similaresen biomarcadores predictivos para terapias dirigidas contra la vía MAPK. (311)

En lo que respecta a *NTRK3 E561stop*, su significado biológico no está descrito en la literatura para ningún tipo de tumor, por lo que en un principio este hallazgo noaportaría información relevante para el paciente más allá de la posibilidad de recibir tratamiento con los fármacos aprobados para las fusiones conocidas de *NTRK3*.

Además de estas dos mutaciones, se detectó una deleción en el gen *FYN*, implicado en la regulación de procesos celulares tales como la remodelación del citoesqueleto, la adhesión celular, la señalización de integrinas, la proliferación o la respuesta inmunitaria y en la mediación de vías de señalización oncogénica tales como ERK, COX-2, STAT5, MET o AKT siendo por tanto promotor de metástasis celular y resistencia farmacológica. Su activación está desencadenada por la señalización oncogénica de la vía de EGFR o FLT3 y su supresión implica una mejora en elpronóstico y la expectativa de vida de los pacientes. (312,313,314)

En nuestro caso, al no haberse detectado ninguna mutación en los genes *EGFR* o *FLT3* ni sobrexpresión en el proteoma de ninguna de las proteínas implicadas en las vías oncogénicas COX-2, STAT5, MET o AKT podemos asumir que esta deleción cursa con la pérdida de función del gen actuando como un factor protector.

En lo que respecta a las mutaciones de la línea germinal, se detectaron alteraciones en 1 de los 7 genes testados, aunque atendiendo al exposoma del paciente en el que destacan factores de riesgo para el desarrollo del adenocarcinoma de pulmón tales como, el hábito tabáquico muy prolongado en el tiempo, la edad avanzada o la presencia de mutaciones somáticas en genes conductores parece más plausible atribuir la causa del tumor a factores externos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La carga mutacional en este paciente es llamativamente baja respecto a su cohorte control, por lo que los resultados negativos para la inestabilidad de microsatélites o la contribución a alguna firma mutacional eran esperables. Esta baja carga también daría lugar a un microambiente tumoral inmunitariamente pobre. El hecho de que hay una baja probabilidad de respuesta al tratamiento con inmunoterapia puede llegar a comprometer la tasa de esperanza de vida a los 5 años siendo por tanto un factor de mal pronóstico.

Analizando los resultados de la expresión del proteoma, la sobreexpresión de TUBB2B cusa con crecimiento celular aberrante, la infiltración celular y la aparición de resistencia farmacológica. Concretamente, en el caso de los adenocarcinomas de pulmón, esta sobreexpresión se ha relacionado con una peor supervivencia por suimplicación en la generación de quimiorresistencia. (315,316)

Por su parte, los trabajos de Meng et al. (2019) ente otros, han puesto de manifiesto la intervención directa de NDUFA4L2 en el mantenimiento de la viabilidad y crecimiento de las células tumorales por represión del estrés oxidativo, convirtiéndolo en una potencial diana terapéutica. (317)

Se sabe que NPM1 se encuentra sobreexpresado en tumores de pulmón, especialmente en aquellos que presentan mutaciones *KRAS* resultados que encajan con los obtenidos por WGS en este caso. La implicación biológica de esta proteína se ha relacionado con el crecimiento descontrolado y proliferación de las células tumorales habiéndose demostrado *in vitro* e *in vivo* que ante la inhibición del gen que codifica esta proteína y que recibe el mismo nombre, se produce una atenuación significativa de la progresión tumoral. Por este motivo, NPM1 se convierte en una potencial diana terapéutica. (318)

Continuando por NDUFAF2, la sobreexpresión de esta proteína de ensamblaje de la membrana mitocondrial se ha relacionado con tumores que presentan una T y una Nmás elevadas y consecuentemente con un estadio tumoral mayor (a través de la afectación de varios procesos de replicación celular) y una peor supervivencia. No obstante, cabe destacar que, pese a ello, la expresión elevada de NDUFAF2 y NDUFA4 también se ha relacionado con una mayor infiltración de células dendríticas y Th2 en el ambiente tumoral favoreciendo la respuesta inmune siendo por tanto un potencial marcador para valorar el uso de inmunoterapia. (319)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La sobreexpresión de la proteína transmembrana de receptores de células B se ha relacionado en la literatura con la leucemia mieloide, aunque su implicación en NSCLC aún no se ha identificado. Finalmente, la sobreexpresión de las proteínas GPD2 y SCN7A, se ha relacionado en adenocarcinoma de pulmón con la progresión de la enfermedad convirtiéndose en un marcador pronóstico. (320,321,322)

En el caso de este paciente, se analizó por práctica clínica rutinaria el estatus mutacional de *EGFR, BRAF, KRAS,* PD-L1, *ALK* y *ROS1* habiéndose obtenido resultados negativos para todos ellos, coincidiendo con los resultados obtenidos por técnicas multiómicas. Comparando los resultados obtenidos por ambas vías, el estudio multiómico del tumor de este paciente proporcionó información valiosa en referencia a las mutaciones halladas en *KRAS* y *NTRK3* que pueden orientar a una nueva opción terapéutica.

Además, cabe destacar que los análisis multiómicos han permitido desentrañar en mayor medida la arquitectura del tumor cuyo desarrollo parece estar principalmente mediado por alteraciones en el correcto desarrollo del ciclo celular y en el control de la proliferación celular.

El paciente tras la cirugía recibió adyuvancia con cisplatino en combinación con vinorelbina, el tratamiento estándar por guías clínicas en esta situación. De cara a tratamientos futuros en caso de progresión, sería interesante disponer de tratamientos dirigidos a la sobreexpresión de TUBB2B, si bien es necesario demostrar mediante ensayos clínicos la eficacia de este enfoque.

En cuanto al paciente 5C9, este destaca notablemente entre todos los pacientes incluidos en este estudio debido al mayor número de alteraciones moleculares que presentaba. De las 10 variables mutacionales somáticas encontradas, (*ALK Q1388K, NTRK D138E, AR H790Q, ATR G2007frameshift, CSF3R H270L, EGFL7 P234Q, FGF2 R181L, FLT4 W1152C, POLD1 W344C* y *TP53 R248L*) no se conoce la significación biológica de ninguna de ellas en adenocarcinoma de pulmón.

Atendiendo a su gen principal y no a su variable concreta, las mutaciones puntuales en *ALK* o *NTRK* son un fenómeno raro, ya que habitualmente la mutación activadora más frecuente para estos genes es la traslocación. Estas mutaciones puntuales se han relacionado como los principales agentes causantes de resistencia secundaria al tratamiento con inhibidores de ALK y NTRK. (323,324)

USC DE COMPOSTELA

La funcionalidad de los andrógenos en el NSCLC aún no ha sido descifrada en su totalidad. La utilidad de conocer y predecir que pacientes pueden tener alteraciones en AR es identificar una variable mutacional sobre la que pueda desarrollarse una terapia dirigida como en el caso de los tumores hormonodependientes (próstata, ovario…). Cabe destacar, que su expresión se ha relacionado directamente con la presencia de alteraciones en *KRAS*. Por su parte, las mutaciones en *ATR* aparecen con mayor frecuencia en SCLC y aunque su relación con el NSCLC están bajo estudio, algunos estudios preclínicos han relacionado la presencia de mutaciones en *ATR* con el aumento de la sensibilidad al tratamiento con radioterapia y quimioterapia. (325,326,327,328,329)

Respecto a *CSF3R, EGFL7* o *FGF2*, el primero de estos genes favorece la infiltración inmune del tumor en adenocarcinoma de pulmón, siendo un indicador de buen pronóstico. *EGFL7*es un gen cuya activación da lugar a la activación de la vía oncogénica NOTCH que ralentiza la disminución de c-Myc dando lugar a la supervivencia de las células tumorales. Normalmente esta mutación se produce como respuesta a la inhibición de EGFR siendo en este caso un marcador de resistencia a la terapia anti-EGFR. En cuanto al tercero de ellos, su actividad oncogénica en NSCLC se ha relacionado con la aparición de progresión celular mediada por actividades autocrinas y paracrinas (angiogénesis). (330,331,332)

Siguiendo la discusión con *FLT4*, la implicación de este gen con el desarrollo de NSCLC no está bien definida, no obstante, se ha relacionado con posibles causas hereditarias y su activación da lugar a una mayor proliferación vascular tumoral y por consiguiente se convierte en un factor de mal pronóstico. (333)

En cuanto a *POLD1*, implicado en la detección de errores en el proceso de replicación del DNA, una mutación en este gen dará lugar a la acumulación de errores y por tanto de genes mutantes en las células siendo esta una posible explicación para la gran cantidad de mutaciones registrada en este paciente. La presencia de mutaciones en *POLD1* también se ha asociado con la aparición de inestabilidad de microsatélites, así como con una mayor eficacia al tratamiento con inhibidores de punto de control inmunitario. (334)

Por último, la presencia de mutaciones en *PT53* se ha relacionado con la desregulación del proceso de apoptosis, la progresión tumoral, la aparición de metástasis en ganglios y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la generación de inestabilidad genómica. La aparición de mutaciones en este gen se ha relacionado con pacientes fumadores y representa un factor de mal pronóstico en estadio tempranos aumentando el riesgo de desarrollar metástasis a distancia. (335)

Además de estas 10 mutaciones, se detectó en el paciente 5C9 una amplificación de la expresión del gen *KRAS*. Podríamos decir que esta amplificación era esperable en presencia de la mutación en *AR* tal y como ya se ha mencionado. La amplificación en la expresión de *KRAS* implicaría una mayor replicación celular y agresividad tumoral habiendo reportado menores tasas de supervivencia global en comparación con los pacientes que no presentan esta alteración. (336)

En cuanto al análisis de mutaciones en genes de la línea germinal, el paciente presentó anomalías en 2 de los genes analizados sin antecedentes familiares. Al haberse encontrado una mutación somática potencialmente accionada por enfermedadeshereditarias (*FLT4*) es recomendable ampliar los estudios genéticos a este nivel para descartar o confirmar un posible origen hereditario.

Así mismo, sería conveniente determinar si alguna de las mutaciones germinales halladas guarda relación con los tumores de próstata y de estroma gastrointestinal(GIST) que el paciente padeció en 2011. De entre las mutaciones somáticas, las mutaciones en *AR* son más frecuentes en tumores de próstata en comparación con NSCLC, así como las mutaciones en *FLT4* y *EGFL7* son compartidas entre tumores de próstata y NSCLC, y las mutaciones en *POLD1, TP53, FGF2, NTRK* o *ALK* se han catalogado para los 3 tumores.

El exposoma del paciente es positivo para hábito tabáquico abusivo (IPA 66) pudiendo haber sido la causa de la mutación en *PT53* normalmente manifestada en pacientes fumadores. La arquitectura de este tumor es altamente compleja presentando numerosas mutaciones que aportan información limitada, por lo que en este caso realizar más pruebas dirigidas a determinar el origen del tumor será crucial para el correcto tratamiento del mismo.

La elevada mutagénesis que presenta este tumor en este caso no ha afectado al sistema de reparación de errores del DNA, estando conservada la estabilidad de microsatélites. No obstante, esta elevada carga mutacional unida a la manifestación de mutación en el gen *POLD1* daría pie a pensar que el perfil de este paciente contribuye a la firma

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mutacional *RefSig10*, por lo que el hecho de que no lo haga podría hacernos pensar que otras mutaciones generan una mayor inestabilidad génica en este tumor.

Cabe destacar que, ante una positividad elevada para todos los marcadores estudiados de punto de control inmunitario, este elevado TMB nos haría pensar en que el paciente presenta un microambiente tumoral inmunorreactivo y que podrá beneficiarse en gran medida del tratamiento con fármacos de punto de control inmunitario.

Si observamos el proteoma, la expresión de proteínas correlaciona con los datos obtenidos por RNA-seq. De entre las proteínas con mayor expresión, la sobreexpresión de MET se ha asociado con un peor pronóstico en este caso posiblemente derivada de laactivación de NTRK. POLD3 por su parte, al ser una subunidad accesoria de lasubunidad catalítica POLD1 su sobreexpresión estaría justificada ante la mutación hallada en POLD1 compartiendo ambas el mismo efecto, la generación de inestabilidad genómica. (337,338)

Continuando con TOP1, su sobreexpresión se ha registrado como frecuente en adenocarcinoma de pulmón ayudando al mantenimiento de la viabilidad tumoral y estableciéndose como un buen marcador al tratamiento con fármacos inhibidores de TOP1. Por otra parte, la sobreexpresión de CDK4 se ha relacionado con un estado patológico mayor que, en este caso, sí se correspondería con el paciente 5C9 que presenta un estadio localmente avanzado (IIIA). Así mismo, la elevación de esta proteína se ha relacionado con una mayor probabilidad de presentar metástasis enganglios y con una supervivencia global notablemente inferior a los pacientes quepresentan niveles bajos de esta proteína. (339,340)

La presencia de TUBB3 se ha descrito en la literatura como un factor de mal pronóstico al contribuir a la mitosis celular descontrolada. También, su sobreexpresión se ha relacionado con la aparición de resistencia a fármacos inhibidores de microtúbulos, taxanos (docetaxel y paclitaxel) y alcaloides de la vinca (vinorelbina) suponiendo una gran limitación terapéutica para el paciente. En esta misma línea, valores elevados de TOP2A dan lugar a la proliferación, migración e invasión celular siendo también este un marcador de mal pronóstico. (341,342)

Por último, la sobreexpresión de PIK3CD podría estar relacionada con la mutación de ALK activadora de la vía oncogénica PI3K/AKT/mTOR cuyos fármacos potencialmente inhibidores para NSCLC se encuentran actualmente en desarrollo. (343)

USC DE COMPOSTELA

A modo de resumen, nos encontramos ante un perfil tumoral altamente heterogéneo de etiología no confirmada. Atendiendo a su arquitectura, el paciente no presentaría una buena respuesta terapéutica al tratamiento con inhibidores de microtúbulos, taxanos (docetaxel y paclitaxel) y alcaloides de la vinca (vinorelbina), mientras si lo haría al tratamiento con radioterapia, quimioterapia, inhibidores de TOP1 o fármacos de punto de control inmunitario.

El análisis molecular realizado por práctica clínica habitual evidenció mutaciones en *P53* y *STK11 G580A* no habiéndose detectado esta última por las técnicas multiómicas. La implicación de esta variable concreta en adenocarcinoma de pulmón es desconocida. Así mismo, se analizó el estatus de PD-L1 obteniéndose un resultado positivo al igual que a través de las técnicas multiómicas. Comparando ambas técnicas, las técnicas multiómicas proporcionaron mayor información sobre la arquitectura del tumor, aunque sería recomendable repetir el análisis de *STK11* para determinar cuál de las dos técnicas está errada y por qué.

Tras la cirugía, el paciente no recibió tratamiento adyuvante pese a ser candidato debido a su edad avanzada y comorbilidades. En la fecha en la que se escribe este trabajo el paciente no ha presentado progresión, hecho llamativo al presentar tantos factores de mal pronóstico. En caso de producirse recurrencia de la enfermedad, sería recomendable realizar más exámenes moleculares en primer lugar para verificar si estamos ante un tumor hereditario o esporádico y consiguientemente tratarlo con la mejor terapia disponible teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis presentado anteriormente.

Continuando por el paciente 5C14, la mutación encontrada en *KRAS G12C* es la variante de mayor prevalencia, apareciendo en hasta un 97% de los tumores *KRAS* mutados. Las alteraciones biológicas principales de esta mutación cursan con la pérdida de la función normal que regulan la proliferación celular. Los fármacos aprobados por laFDA para el tratamiento dirigido contra esta mutación son adagrasib y sotorasib (para más información ver capítulo 1 apartado 3.4.1). (344,345)

Además de la mutación en *KRAS G12C*, se detectaron otras 3 mutaciones conductoras en *CYP19A1 L21F, HGF R468L* y *PIK3R2 E648stop*. La implicación biológica de la primera de ellas en adenocarcinoma de pulmón es desconocida, aunque el gen principal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y otros polimorfismos de este si se ha puesto en relación con el aumento del riesgo de padecer cáncer de pulmón. (346,347)

Para la segunda variable mutacional, la implicación biológica de esta variable concreta es igualmente desconocida. No obstante, es conocido que el gen *HGF* codifica elligando natural de la tirosina quinasa MET cuya expresión aberrante da lugar a la sobreexpresión de la vía de MET que en último término aumenta la supervivencia celular, la motilidad, la angiogénesis y la aparición de metástasis. Así mismo, el eje MET/HGF desempeña un papel importante en el desarrollo de radiorresistencia y quimiorresistencia a platinos, taxanos, camtotecinas y antraciclinas al inhibir la apoptosis mediante la activación de la vía PI3K-AKT. También, este eje interactúa con las vías de señalización oncogénica EGFR y VEGFR generando resistencia a las terapias dirigidas anti-EGFR y anti-VEGFR. Por todo lo anteriormente nombrado, la mutación en *HGF* cursaría con una peor evolución y supervivencia. (348)

Para la última de estas tres variables, tampoco se conoce la implicación biológicaconcreta, aunque el gen *PIK3R2* codifica una subunidad reguladora de PI3-quinasa, que es un componente de la vía de señalización oncogénica PI3K/AKT/mTOR implicada en los procesos reguladores de crecimiento, proliferación o apoptosis celular entre otros. En adenocarcinoma de pulmón, la expresión de *PIK3R2* se ha relacionado con mal pronóstico clínico, con la metilación del DNA y con una baja infiltración de células inmunes en el tumor. (348)

Si hablamos de las mutaciones en línea germinal en esta paciente solamente se detectó un gen mutado de los 7 analizados por lo que ante un exposoma que refleja el hábito tabáquico más elevado del grupo (IPA 70) sumado a la detección de mutaciones en varios genes somáticos altamente oncogénicos podemos inferir que hay una mayor probabilidad de que este tumor sea esporádico que hereditario. No obstante, debido a losmúltiples antecedentes familiares y personales sería conveniente realizar análisis germinales más profundos.

En lo que respecta a la carga mutacional, esta presenta valores medios por lo que, aunque no es suficiente para generar inestabilidad de microsatélites o contribuir aalguna firma mutacional si pudiera contribuir a la infiltración de células inmunes especialmente ante una expresión positiva de PD-L1 y negativa de PD-1 (evitando la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

unión de células tumorales y el potenciamiento de la activación de la vía mTOR y por tanto la proliferación celular independiente del sistema inmune).

Continuando por la expresión del proteoma, NDUFV3 estaría relacionada con una replicación celular aberrante. Aunque su mecanismo de actuación concreto no está bien determinado se ha relacionado con el aumento de la glicólisis celular. La expresión elevada de MET y PIK3CD sí sería esperable ante la mutación en *HGF* y *PIK3R2* al intervenir en las vías oncogénicas que ya se ha comentado que activan estos genes. (349)

En lo que respecta a CCDC6 (implicado en los puntos de control del ciclo celular y reparación del DNA) su sobreexpresión se ha relacionado en NSCLC con la aparición de resistencia a cisplatino y sensibilidad a los inhibidores de PARP, cerrando y abriendo al mismo tiempo una opción terapéutica. (350)

Por su parte, la sobreexpresión de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa α-1 (POLA1) podría intervenir en algún punto en la generación de resistencia a erlotinib. Por otra parte, el significado de la sobreexpresión de la proteína EML4 sin estar fusionada con ALK es desconocido en NSCLC. (351)

Respecto a ERBB2 su sobreexpresión se ha asociado con mutaciones *KRAS* tal y como sucede en esta paciente, relacionándose con un peor pronóstico y supervivencia. Finalmente, la expresión elevada de RRM1 se ha relacionado con una mejor respuesta terapéutica en estadios avanzados para el tratamiento con gemcitabina, aunque sin conseguir un aumento en la supervivencia global. (352,353,354)

A modo de resumen, el tumor de la paciente 5C14 presenta una arquitectura compleja con marcadores de radiorresistencia y quimiorresistencia a platinos, así comomarcadores de resistencia a fármacos como taxanos, camptotecinas, antraciclinas, anti- EGFR, anti-VEGF, gemcitabina o erlotinib reduciendo considerablemente las opciones terapéuticas disponibles y siendo todos ellos factores de mal pronóstico.

Por práctica clínica habitual en esta paciente se realizaron estudios moleculares e inmunohistoquímicos para valorar el estatus de PD-L1 y *KRAS* coincidiendo los resultados con los obtenidos por los análisis multiómicos. Si comparamos los resultados obtenidos por ambas técnicas los análisis multiómicos han presentado información

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

valiosa a cerca de las mutaciones conductoras halladas, así como a nivel de marcadores pronósticos y de resistencia.

Tras la cirugía la paciente no recibió adyuvancia, presentando una primera progresión al año de la cirugía para la que fue tratada con CCRT con carboplatino y paclitaxel. En marzo de 2023 presentó una segunda progresión y se inició un anticuerpo monoclonal anti PD-1 (pembrolizumab), pero desgraciadamente solo pudo recibir un ciclo por deterioro general y finalmente en abril de 2023.

Teniendo en cuenta los resultados multiómicos, el tratamiento con CCRT con cisplatino y paclitaxel no sería el más indicado al presentarse indicadores de posible resistencia y pudiendo ser este el motivo de la rápida progresión al tratamiento. Desde un punto de vista teórico se podría valorar el uso de terapia dirigida contra *KRAS G12C*, inhibidores de PARP o inmunoterapia anti PD-L1 dentro de un EECC.

El paciente 5C15, último del grupo de los diagnosticados con adenocarcinoma depulmón presentó dos mutaciones génicas, una en *KRAS G12D* y otra en *TP53 R156RR*. Los estudios de Liu et al. (2022), Xie et al. (2021) y Ricciuti et al. (2022) entre otros, han puesto en evidencia la aparición de *KRAS G12D* especialmente en pacientes no fumadores o con un consumo bajo de tabaco que además presentan un TMB bajo y una expresión de PD-L1 negativa o muy baja, encajando estos datos exactamente con el perfil del paciente 5C15. (355,356,357)

Además, esta variante mutacional concreta, reguladora al alza de la vía oncogénica MAPK, cursa con una menor infiltración de células TCD8+ en el ambiente tumoral, lo que sumado a la baja o nula expresión de PD-(L)1 convierte a esta mutación en un factor de peor pronóstico y supervivencia global ante la baja efectividad del tratamiento con fármacos de punto de control inmunitario. Por el contrario, la presencia de la mutación *KRAS G12D* suele responder mejor al tratamiento con quimioterapia sola o en combinación con un anti-PD-1/PD-L1 así como al tratamiento con trametinib, cobimetinib, binimetinib y con el fármaco experimental RMC-6236. (355,356,357,358)

Por su parte, la variable mutacional *TP53 R156RR* está potencialmente relacionada con la inactivación del gen *PT53* implicado en la transcripción de las proteínas que median en los procesos celulares de apoptosis, por lo que su pérdida de función da lugar a células con DNA dañado y con mayor inestabilidad genómica. Pese a ello, es llamativo como en nuestro paciente se ha registrado un TMB anormalmente bajo para su

USC DE COMPOSTELA

patología, así como inestabilidad de microsatélites negativa, aunque el perfil del paciente si ha contribuido a las firmas mutacionales *RefSig MMR1* y *RefSig MMR2* directamente relacionadas con la presencia de inestabilidad de microsatélites. Por tanto, nos encontramos con datos contradictorios, evidenciándose la necesidad de realizar más estudios para clarificar la posible relación e interacción entre las mutaciones *KRAS G12D* y *TP53 R156RR* con estos hallazgos. (359)

Con respecto a las mutaciones germinales, solamente se encontraron alteraciones en un gen entre los 7 analizados. En este paciente, sería recomendable hacer más análisis a este respecto ya que, aunque presenta dos mutaciones somáticas conductoras, el exposoma es negativo con respecto a los factores de predisposición al desarrollo de adenocarcinoma de pulmón.

Los resultados obtenidos tras el estudio del proteoma en este paciente son singularmente homogéneos. Mientras que en el resto de los pacientes encontrábamos un proteoma heterogéneo, la mitad de las proteínas con mayor expresión en este paciente pertenecen a la familia NDUFAF, así como dos de ellas pertenecen a la familia MT-ND.

La sobreexpresión de NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFB9, MT-ND1 y MT-ND3 provoca alteraciones en el correcto desarrollo de la respiración mitocondrial que dan lugar a una replicación celular descontrolada. Concretamente, NDUFAF3 se encuentra sobreexpresada y fosforilada en pacientes con mutación en *KRAS G12C*, por lo que es posible que su aumento sea debido a la presencia de mutación en *KRAS G12D*. (319,360,361)

CDK4 y PIK3CA son las otras dos proteínas sobreexpresadas en el perfil proteico de este paciente. PIK3CA formaría parte de la cascada de respuesta ante la activación de la vía oncogénica PI3K/AKT/mTOR derivada de las mutaciones presentes en *PT53* y *KRAS*. La proteína derivada de PIK3CA se ha asociado con presencia de metástasis a distancia, así como con un tiempo libre de progresión menor, siendo por tanto un marcador de mal pronóstico. Por su parte, el aumento de CDK4 daría lugar a la entrada de la célula en la fase G y S del ciclo celular de manera descontrolada induciendo la progresión celular siendo una potencial diana terapéutica para el paciente. (362,363,364)

Resumiendo, el paciente presenta un perfil tumoral generado principalmente por alteraciones en la respiración mitocondrial que han dado lugar a dos mutaciones

USC DE COMPOSTELA

conductoras activadoras de la vía oncogénica PI3K/AKT/mTOR. Además, este perfil da indicios sobre una posible baja efectividad ante el tratamiento con inmunoterapia presentando sensibilidad a la quimioterapia, así como a los fármacos trametinib, cobimetinib, binimetinib y al fármaco experimental RMC-6236.

Los análisis realizados por rutina en este paciente solamente evaluaron la estabilidad de microsatélites, obteniéndose los mismos resultados que mediante los análisis multiómicos. Comparando ambas metodologías, los análisis multiómicos han aportado información relevante con respecto al estatus mutacional, el tratamiento y el pronóstico de este tumor.

Tras la cirugía radical el paciente no recibió tratamiento adyuvante ni se ha producido progresión de la enfermedad hasta la fecha, por lo que ante una posible recurrencia futura se aconseja explorar ensayos clínicos con alguno de los fármacos presentados anteriormente.

Si comparamos el perfil obtenido para los 4 pacientes con adenocarcinoma de pulmón, podemos decir que presentan un perfil más heterogéneo que en el caso de los adenocarcinomas de CRC. Se detectó en todos ellos mutación conductora (considerando las amplificaciones) en *KRAS*. La otra similitud que presentan los 4 pacientes es la presencia de estabilidad de microsatélites. Por el contrario, no se identificó ninguna proteína compartida por todos ellos ni tampoco una expresión compartida de marcadores de punto de control inmunitario.

Comparando los perfiles de ambos grupos, aunque no encontramos una característica común, si se identifican como más prevalentes la sobreexpresión de proteínas de las familias POLD, POLE, NDUFA, TOP y MET pudiendo ser esta una vía de investigación para establecer similitudes entre estos dos tipos de tumor.

En conclusión, cabe mencionar tanto las fortalezas como las debilidades de este trabajo. A nivel operacional, mediante este trabajo se ha demostrado que es factible establecer un circuito de recogida de muestras tanto séricas como de tejido, y su procesado dentro de un hospital, si bien requiere un alto grado de coordinación e implicación por parte de varios servicios quirúrgicos, AP, etc.…

A través de este estudio, también se ha obtenido un análisis exhaustivo de las muestras tumorales a través de técnicas diversas que han proporcionado información detallada y

abundante sobre los tumores de los pacientes incluidos. Así mismo, Se ha demostrado que la realización de análisis multiómicos enriquece los datos de rutina que estudiamos dentro de un circuito puramente asistencial, y que además pueden tener implicación en la selección de tratamiento.

Además de una implicación en la selección de tratamiento el mayor conocimiento molecular de los tumores ayuda a progresar en el entendimiento de las bases moleculares de la enfermedad. Para enriquecer los resultados, sería interesante realizar mediciones seriadas de ctDNA sobre las muestras de suero recogidas como método de seguimiento tras cirugía, o como un factor para decantase por un tratamiento adyuvante o no (p.ej. si no hay ctDNA detectable tras cirugía observación, y si se detecta necesidadde tratamiento más intenso y seguimiento más estrecho).

Con respecto a las debilidades, este estudio se ha realizado en un número muy limitado de pacientes en los que a pesade de haber hecho un control riguroso de la toma de muestras, de la n inicial de 14 pacientes solamente pudieron analizarse de modo completo 7 pacientes. Además, el hecho de haber recogido muestras de dos tipos de tumores (3 pacientes con adenocarcinoma de CRC y 4 pacientes con adenocarcinoma depulmón) reduce aún en mayor medida la representatividad de cada grupo.

Por otro lado, mucha de la información obtenida todavía no se traduce en decisiones prácticas, ya que para muchas de las alteraciones detectadas falta información sobre su significado. Incluso cuando se identifican alteraciones relevantes el acceso a fármacos puede ser complicado por falta de acceso a ensayos clínicos o cuestiones regulatorias. Este acontecimiento, pone de manifiesto el hecho de que el propio diseño de los ensayos clínicos debe cambiar, tendiendo a modelos más flexibles, con menor número de pacientes, adaptándose a las necesidades reales de los mismos.

Finalmente, cabe destacar tanto el elevado coste como la gran cantidad de tiempo que es necesario invertir para obtener los resultados de los análisis multiómicos, no habiendo estado disponibles para los pacientes de este estudio en el momento de la toma de decisiones clínicas referentes a la elección de tratamiento tras la cirugía radical.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Conclusiones

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 6: Conclusiones

Tras el análisis expuesto anteriormente, se presentan las siguientes conclusiones:

1. Se estableció un circuito de recogida y procesamiento de muestras a lo largo de las tres etapas del estudio, garantizando la comunicación y colaboración efectiva entre los equipos participantes, así como la estandarización y trazabilidad de la recogida y análisis de las muestras independientemente del canal de procedencia del paciente.

2. Se creó una base de datos clínica de cada paciente en la que se recogieron todos los datos planteados. Estos datos fueron cotejados para evaluar su posible relación con los resultados obtenidos de las técnicas multiómicas, así como su impacto en la supervivencia. Los factores exógenos que se han podido relacionar con el desarrollo del adenocarcinoma colorrectal son el sobrepeso, el sedentarismo y el consumo elevado de carne, mientras que en el adenocarcinomade pulmón fue el tabaquismo.

3. En los pacientes con adenocarcinoma colorrectal, se identificaron 3 variables mutacionales, 5 amplificaciones, 3 deleciones y 20 proteínas ya conocidas, así como una variable mutacional no conocida (*CSF3R P272L).* En los pacientes con adenocarcinoma de pulmón, se detectaron 4 variables mutacionales, una amplificación, una deleción y 28 proteínas ya conocidas. También se detectaron 14 variables mutacionales no conocidas. El pequeño tamaño muestral no permitió validar estos hallazgos como potenciales biomarcadores.

4. Se detectaron tanto marcadores que comprometen como que favorecen el pronóstico en todos los pacientes incluidos. No obstante, debido al reducido tamaño muestral, no se pudo validar ningún marcador pronóstico de SLP o SG.

5. Se detectaron, en 6 de los 7 pacientes analizados, correlaciones entre los hallazgos de las técnicas multiómicas y las posibles vías de señalización celular, siendo las vías ERK/MAPK y PI3K/AKT/mTOR las dos más frecuentes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. Se encontraron en todos los pacientes alteraciones moleculares potencialmente relacionadas con la generación de resistencia o afinidad a tratamientos conocidos, originando este hecho un potencial beneficio directo sobre la estrategia terapéutica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bibliografía

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Bibliografía

1. *Cáncer*. (s. f.). Organización Mundial de la Salud. Recuperado 11 de marzo de 2022, de https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1
2. Valdespino-Gómez, V. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2011). Iniciación y progresión del cáncer: un sistema biológico. *Gaceta Mexicana de Oncología*, *10*(6), 358–365. https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-iniciacion-progresion-del-cancer-un-X1665920111969256#tbl1
3. Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M. C., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P., & Canaider, S. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. Annals of human biology, 40(6), 463–471. https://doi.org/10.3109/03014460.2013.807878
4. Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings*, *83*(5), 584–594. https://doi.org/10.4065/83.5.584
5. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and MortalityWorldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: a cancer journal for clinicians, 71(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660
6. De la Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. Clinics in chest medicine, 32(4), 605–644. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001
7. The International Agency for Research on Cancer (IARC). (s. f.). Global Cancer Observatory. https://gco.iarc.fr/
8. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. CA: a cancer journal for clinicians, 71(1), 7–33. https://doi.org/10.3322/caac.21654
9. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., & Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. European Journal of Cancer, 103, 356–387. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005
10. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., & Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. European journal of cancer (Oxford, England : 1990), 103, 356–387. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005
11. Cancer of the Colon and Rectum - Cancer Stat Facts. (s. f.). SEER. Recuperado 20 de marzo de 2022, de https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html
12. Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. Contemporary oncology (Poznan, Poland), 25(1), 45–52. https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829
13. Kanwal M, Ding XJ, Cao Y. Familial risk for lung cancer. Oncol Lett 2017; 13: 535-542
14. Remon, J., Reguart, N., García-Campelo, R., Conde, E., Lucena, C. M., Pervisa, O., & Navarro-Martín, A. (2020). Lung Cancer in Spain. Journal of Thoracic Oncology, 16, 197–204. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.09.02
15. Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. Cancers, 13(9), 2025. https://doi.org/10.3390/cancers13092025
16. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer. Disponibleonline: https://www.wcrf.org/dietandcancer (consultado el 22 marzo 2022).
17. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017–2019; American Cancer Society: Atlanta, GA, USA, 2017

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

18. Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. Przeglad gastroenterologiczny, 14(2), 89–103. https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072
19. Ellis, L.; Abrahão, R.; McKinley, M.; Yang, J.; Somsouk, M.; Marchand, L.L.; Cheng, I.; Gomez, S.L.; Shariff-Marco, S. Colorectal Cancer Incidence Trends by Age, Stage, and Racial/Ethnic Group in California, 1990-2014. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 2018, 27, 1011–1018.
20. World Health Organization (WHO). WHO report on the global tobacco ep-idemic 2019: offer help to quit tobacco use. WHO; 2020. Disponible online: https://www.who.int/publications/i/item/9789241516204 (consultado el 22 marzo 2022)
World Health Organization (WHO). WHO global report on trends in prev-alence of tobacco use 2000-2025. 3rd ed. WHO; 2019. Disponible online: https://www.who.int/publications/i/item/who-global-report-on-trends-in-prevalence-of-tobacco-use-2000-2025-third-edition (consultado el 22 marzo 2022).
21. de Koning, H. J., van der Aalst, C. M., de Jong, P. A., Scholten, E. T., Nackaerts, K., Heuvelmans, M. A., Lammers, J. W. J., Weenink, C., Yousaf-Khan, U., Horeweg, N., van 't Westeinde, S., Prokop, M., Mali, W. P., Mohamed Hoesein, F. A., van Ooijen, P. M., Aerts, J.G., den Bakker, M. A., Thunnissen, E., Verschakelen, J., . . . Oudkerk, M. (2020). Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. New England Journal of Medicine, 382(6), 503–513. https://doi.org/10.1056/nejmoa1911793
22. Macrae, F. A. (s. f.). Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. UptoDate. Recuperado 23 de marzo de 2022, de https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors
23. Rothwell, P. M., Wilson, M., Elwin, C. E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C. P., & Meade, T. W. (2010). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. Lancet (London, England), 376(9754), 1741–1750. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61543-7
24. Samadder, N. J., Kuwada, S. K., Boucher, K. M., Byrne, K., Kanth, P., Samowitz, W., Jones, D., Tavtigian, S. V., Westover, M., Berry, T., Jasperson, K., Pappas, L., Smith, L., Sample, D., Burt, R. W., & Neklason, D. W. (2018). Association of Sulindac and Erlotinib vs Placebo With Colorectal Neoplasia in Familial Adenomatous Polyposis: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. JAMA oncology, 4(5), 671–677. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.5431
25. Levin, B., Lieberman, D. A., McFarland, B., Smith, R. A., Brooks, D., Andrews, K. S., Dash, C., Giardiello, F. M., Glick, S., Levin, T. R., Pickhardt, P., Rex, D. K., Thorson, A., Winawer, S. J., American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group, US Multi-Society Task Force, & American College of Radiology Colon Cancer Committee (2008). Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. CA: a cancer journal for clinicians, 58(3), 130–160. https://doi.org/10.3322/CA.2007.0018
26. Gao, Y., Zhou, R., & Lyu, Q. (2020). Multiomics and machine learning in lung cancer prognosis. Journal of thoracic disease, 12(8), 4531–4535. https://doi.org/10.21037/jtd-2019-itm- 013
27. Alorda-Clara, M., Torrens-Mas, M., Morla-Barcelo, P. M., Martinez-Bernabe, T., Sastre-Serra, J., Roca, P., Pons, D. G., Oliver, J., & Reyes, J. (2022). Use of Omics Technologies for the Detection of Colorectal Cancer Biomarkers. Cancers, 14(3), 817. https://doi.org/10.3390/cancers14030817
28. Dao, D., & Le, P. H. (2021). Histology, Goblet Cells. In StatPearls. StatPearls Publishing.
29. Halaoui, R., & McCaffrey, L. (2014). Rewiring cell polarity signaling in cancer. Oncogene, 34(8), 939–950. https://doi.org/10.1038/onc.2014.59
30. Hinck, L., & Näthke, I. (2014). Changes in cell and tissue organization in cancer of the breast and colon. Current Opinion in Cell Biology, 26, 87–95. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.11.003

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

31. Yamaguchi, H., Wyckoff, J., & Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. Current opinion in cell biology, 17(5), 559–564. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.002
32. Genes del Cáncer. (s. f.). CancerQuest. https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/genes-de-cancer
33. King, V. L., Leclair, N. K., Coulter, A. M., & Campellone, K. G. (2021). The actin nucleation factors JMY and WHAMM enable a rapid Arp2/3 complex-mediated intrinsic pathway of apoptosis. PLOS Genetics, 17(4), e1009512. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009512
34. Grady W. M. (2007). Making the case for DCC and UNC5C as tumor-suppressor genes in the colon. Gastroenterology, 133(6), 2045–2049. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.034
35. Cain, R. J., & Ridley, A. J. (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. Biology of the cell, 101(1), 13–29. https://doi.org/10.1042/BC20080079
36. O'Leary, K., Shia, A., & Schmid, P. (2018). Epigenetic Regulation of EMT in Non-Small Cell Lung Cancer. Current cancer drug targets, 18(1), 89–96. https://doi.org/10.2174/1568009617666170203162556
37. Vu, T., & Datta, P. K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. Cancers, 9(12), 171. https://doi.org/10.3390/cancers9120171
38. Tanabe, S., Quader, S., Cabral, H., & Ono, R. (2020). Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies. Frontiers in Pharmacology, 11. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00904
39. Kreus, M., Lehtonen, S., Skarp, S., & Kaarteenaho, R. (2021). Extracellular matrix proteins produced by stromal cells in idiopathic pulmonary fibrosis and lung adenocarcinoma. PLOS ONE, 16(4), e0250109. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250109
40. Mo, A., Jackson, S., Varma, K., Carpino, A., Giardina, C., Devers, T. J., & Rosenberg, D. W. (2016). Distinct Transcriptional Changes and Epithelial–Stromal Interactions Are Altered in Early-Stage Colon Cancer Development. Molecular Cancer Research, 14(9), 795–804. https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-16-0156
41. Barrionuevo Cornejo, Carlos, & Dueñas Hancco, Daniela. (2019). Clasificación actual del carcinoma de pulmón. Consideraciones histológicas, inmunofenotípicas, moleculares y clínicas. Horizonte Médico (Lima), 19(4), 74-83. https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n4.11
42. Rodríguez Carnero, P., & Bustos García De Castro, A. (2014). Los patrones de vascularización pulmonar en la radiografía simple de tórax. Radiología, 56(4), 346–356. https://doi.org/10.1016/j.rx.2013.10.003
43. Drake, R. L. (2018). Gray: Anatomía básica (2a Edición) (2.a ed.). Elsevier España, S.L.U.
44. Martinez Mesa, A., Reina Marfil, N., Cabrera Cesar, E., Aguilar Galvez, A., Sanchez, E., & Fernandez Aguirre, M. C. (2020). Evolution in the pathological study of lung cancer. Lung cancer. https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2020.2918
45. Arellano, P. J. L. (2013). Sisinio de Castro. Manual de patología general (+ StudentConsult en español) (7a edición) (7.a ed.). Elsevier España, S.L.U.
46. Wang, Jing-yuan, Wang, Xue-min, Xu, Xiao-yan, Li, Shi-rong, & Liu, Xiu-lan. (2020). Expression and Significance of CK5/6, P63, P40, CK7, TTF-1, NapsinA, CD56, Syn and CgA in Biopsy Specimen of Squamous Cell Carcinoma, Adenocarcinoma and Small Cell Lung Carcinoma. International Journal of Morphology, 38(2), 247-251. https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022020000200247.
47. Duffy, M. J., & O'Byrne, K. (2018). Tissue and Blood Biomarkers in Lung Cancer: A Review. Advances in Clinical Chemistry, 1–21. https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.05.001
48. Clinical tumour markers in lung cancer. (1995). Lung Cancer, 13(2), 211. https://doi.org/10.1016/0169-5002(95)90632-0
49. Hayoun Chaara, C., Alvarez Vazquez, A., Daimiel Naranjo, I., Fernandez Alfonso, A., Ortega Medina, L., & Martinez De Vega, V. (2018). Adenocarcinoma de pulmón:: correlación radio-patológica y diagnóstico precoz. *Seram*. Recuperado a partir de https://piper.espacio-seram.com/index.php/seram/article/view/1346
50. Pinilla, I., & Gómez León, N. (2009). Utilidad de la PET/TC en el cáncer de pulmón. Radiología, 51(3), 248–260. https://doi.org/10.1016/j.rx.2009.01.007

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

51. Sehgal, I. S., Gupta, N., Dhooria, S., Aggarwal, A. N., Madan, K., Jain, D., Gupta, P., Madan, N. K., Rajwanshi, A., & Agarwal, R. (2020). Processing and Reporting of Cytology Specimens from Mediastinal Lymph Nodes Collected using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration: A State-of-the-Art Review. Journal of cytology, 37(2), 72–81. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_100_19
52. Lababede, O., & Meziane, M. A. (2018). The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams. The oncologist, 23(7), 844–848. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0659
53. Carrot-Zhang, J., Yao, X., Devarakonda, S., Deshpande, A., Damrauer, J. S., Silva, T. C., Wong, C. K., Choi, H. Y., Felau, I., Robertson, A. G., Castro, M. A., Bao, L., Rheinbay, E., Liu, E. M., Trieu, T., Haan, D., Yau, C., Hinoue, T., Liu, Y., . . . Shen, H. (2021). Whole-genome characterization of lung adenocarcinomas lacking alterations in the RTK/RAS/RAF pathway. Cell Reports, 34(5), 108707. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108707
54. Wang, X., Li, J., Duan, Y., Wu, H., Xu, Q., & Zhang, Y. (2017). Whole genome sequencing analysis of lung adenocarcinoma in Xuanwei, China. Thoracic cancer, 8(2), 88–96. https://doi.org/10.1111/1759-7714.12411
55. Chang, Y. S., Tu, S. J., Chen, Y. C., Liu, T. Y., Lee, Y. T., Yen, J. C., Fang, H. Y., & Chang, J. G. (2021). Mutation profile of non-small cell lung cancer revealed by next generation sequencing. Respiratory Research, 22(1). https://doi.org/10.1186/s12931-020-01608-5
56. Luo, W., Tian, P., Wang, Y., Xu, H., Chen, L., Tang, C., Shu, Y., Zhang, S., Wang, Z., Zhang, J., Zhang, L., Jiang, L., Liu, L., Che, G., Guo, C., Zhang, H., Wang, J., & Li, W. (2018). Characteristics of genomic alterations of lung adenocarcinoma in young never-smokers. International journal of cancer, 143(7), 1696–1705. https://doi.org/10.1002/ijc.31542
57. Simons, M. J. H. G., Retèl, V. P., Ramaekers, B. L. T., Butter, R., Mankor, J. M., Paats, M. S., Aerts, J. G. J. V., Mfumbilwa, Z. A., Roepman, P., Coupé, V. M. H., Uyl-de Groot, C. A., van Harten, W. H., & Joore, M. A. (2021). Early Cost Effectiveness of Whole-Genome Sequencing as a Clinical Diagnostic Test for Patients with Inoperable Stage IIIB,C/IV Non-squamous Non-small-Cell Lung Cancer. PharmacoEconomics, 39(12), 1429–1442. https://doi.org/10.1007/s40273-021-01073-y
58. van de Ven, M., IJzerman, M., Retèl, V., van Harten, W., & Koffijberg, H. (2022). Developing a dynamic simulation model to support the nationwide implementation of whole genome sequencing in lung cancer. BMC Medical Research Methodology, 22(1). https://doi.org/10.1186/s12874-022-01571-3
59. Wang, D., & Farhana, A. (2022, 8 mayo). Biochemistry, RNA Structure. National Library of Medicine. Recuperado 22 de mayo de 2022, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/
60. Smolander, J., Stupnikov, A., Glazko, G., Dehmer, M., & Emmert-Streib, F. (2019). Comparing biological information contained in mRNA and non-coding RNAs for classification of lung cancer patients. BMC Cancer, 19(1). https://doi.org/10.1186/s12885-019-6338-1
61. Fan, Z., Xue, W., Li, L., Zhang, C., Lu, J., Zhai, Y., Suo, Z., & Zhao, J. (2018). Identification of an early diagnostic biomarker of lung adenocarcinoma based on co-expression similarity and construction of a diagnostic model. Journal of Translational Medicine, 16(1). https://doi.org/10.1186/s12967-018-1577-5
62. Zhao, J., Cheng, W., He, X., Liu, Y., Li, J., Sun, J., Li, J., Wang, F., & Gao, Y. (2018). Construction of a specific SVM classifier and identification of molecular markers for lung adenocarcinoma based on lncRNA-miRNA-mRNA network. OncoTargets and Therapy, Volume 11, 3129–3140. https://doi.org/10.2147/ott.s151121
63. Umu, S. U., Langseth, H., Zuber, V., Helland, S., Lyle, R., & Rounge, T. B. (2022). Serum RNAs can predict lung cancer up to 10 years prior to diagnosis. eLife, 11. https://doi.org/10.7554/elife.71035
64. Li, X., Li, B., Ran, P., & Wang, L. (2018). Identification of ceRNA network based on a RNA-seq shows prognostic lncRNA biomarkers in human lung adenocarcinoma. Oncology Letters. https://doi.org/10.3892/ol.2018.9336

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

65. Jiang, A., Wang, J., Liu, N., Zheng, X., Li, Y., Ma, Y., Zheng, H., Chen, X., Fan, C., Zhang, R., Fu, X., & Yao, Y. (2022). Integration of Single-Cell RNA Sequencing and Bulk RNA Sequencing Data to Establish and Validate a Prognostic Model for Patients With Lung Adenocarcinoma. Frontiers in Genetics, 13. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.833797
66. Kuang, P., Chen, P., Wang, L., Li, W., Chen, B., Liu, Y., Xu, Y., Wang, H., Zhao, S., Ye, L., Yu, F., Ji, H., & He, Y. (2020). RNA sequencing analysis of small cell lung cancer reveals candidate chemotherapy insensitivity long noncoding RNAs and microRNAs. Annals of Translational Medicine, 8(4), 121. https://doi.org/10.21037/atm.2020.01.75
67. Carrillo-Perez, F., Morales, J. C., Castillo-Secilla, D., Molina-Castro, Y., Guillén, A., Rojas, I., & Herrera, L. J. (2021). Non-small-cell lung cancer classification via RNA-Seq and histology imaging probability fusion. BMC Bioinformatics, 22(1). https://doi.org/10.1186/s12859-021-04376-1
68. Fauteux, F., Surendra, A., McComb, S., Pan, Y., & Hill, J. J. (2021). Identification of transcriptional subtypes in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma through integrative analysis of microarray and RNA sequencing data. Scientific Reports, 11(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-88209-4
69. Cheung, C. H. Y., & Juan, H. F. (2017). Quantitative proteomics in lung cancer. Journal of Biomedical Science, 24(1). https://doi.org/10.1186/s12929-017-0343-y
70. Haghjoo, Niloofar; moeini, Ali; Masoudi-Nejad, Ali (2020). *Introducing a panel for early detection of lung adenocarcinoma by using data integration of genomics, epigenomics, transcriptomics and proteomics. Experimental and Molecular Pathology, 112(), 104360–*. doi:10.1016/j.yexmp.2019.104360
71. Boccellino, M., Pinto, F., Ieluzzi, V., Giovane, A., Quagliuolo, L., Fariello, C., Coppola, M., Carlucci, A., Santini, M., Ferati, K., Bexheti-Ferati, A., Giordano, A., & di Domenico, M. (2019). Proteomics analysis of human serum of patients with non-small-cell lung cancer reveals proteins as diagnostic biomarker candidates. Journal of Cellular Physiology, 234(12), 23798– 23806. https://doi.org/10.1002/jcp.28948
72. Xu, J. Y., Zhang, C., Wang, X., Zhai, L., Ma, Y., Mao, Y., Qian, K., Sun, C., Liu, Z., Jiang, S., Wang, M., Feng, L., Zhao, L., Liu, P., Wang, B., Zhao, X., Xie, H., Yang, X., Zhao, L., . . . Tan, M. (2020). Integrative Proteomic Characterization of Human Lung Adenocarcinoma. Cell, 182(1), 245–261.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.043
73. López-Sánchez, L. M., Jurado-Gámez, B., Feu-Collado, N., Valverde, A., Cañas, A., Fernández-Rueda, J. L., Aranda, E., & Rodríguez-Ariza, A. (2017). Exhaled breath condensate biomarkers for the early diagnosis of lung cancer using proteomics. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 313(4), L664-L676. https://doi.org/10.1152/ajplung.00119.2017
74. Yu, K. H., Berry, G. J., Rubin, D. L., Ré, C., Altman, R. B., & Snyder, M. (2017). Association of Omics Features with Histopathology Patterns in Lung Adenocarcinoma. Cell Systems, 5(6), 620–627.e3. https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.10.014
75. Seijo, L. M., Peled, N., Ajona, D., Boeri, M., Field, J. K., Sozzi, G., Pio, R., Zulueta, J. J., Spira, A., Massion, P. P., Mazzone, P. J., & Montuenga, L. M. (2019). Biomarkers in Lung Cancer Screening: Achievements, Promises, and Challenges. Journal of Thoracic Oncology, 14(3), 343–357. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.11.023
76. Luo, C., Cen, S., Ding, G., & Wu, W. (2019). Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options. Cancer communications (London, England), 39(1), 13. https://doi.org/10.1186/s40880-019-0361-0
77. Benesch, M., & Mathieson, A. (2020). Epidemiology of Signet Ring Cell Adenocarcinomas. Cancers, 12(6), 1544. https://doi.org/10.3390/cancers12061544
78. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. Journal of gastrointestinal oncology, 3(3), 153–173. https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
79. Choi, J. E., Bae, J. S., Kang, M. J., Chung, M. J., Jang, K. Y., Park, H. S., & Moon, W. S. (2017). Expression of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell markers in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

colorectal adenocarcinoma: Clinicopathological significance. Oncology Reports, 38(3), 1695–1705. https://doi.org/10.3892/or.2017.5790

80. García-Figueiras, R., Baleato-González, S., Padhani, A. R., Luna-Alcalá, A., Marhuenda, A., Vilanova, J. C., Osorio-Vázquez, I., Martínez-de-Alegría, A., & Gómez-Caamaño, A. (2018). Advanced Imaging Techniques in Evaluation of Colorectal Cancer. RadioGraphics, 38(3), 740–765. https://doi.org/10.1148/rg.2018170044
81. Gómez Huertas, M., Pérez Rosillo, M. A., Salmerón Ruiz, A., & Medina Benitez, A. (2018). Aportación del TC en la estadificación del carcinoma de colon. Seram. Recuperado a partir de https://piper.espacio-seram.com/index.php/seram/article/view/1724
82. Hultcrantz, R. (2020). Aspects of colorectal cancer screening, methods, age and gender. Journal of Internal Medicine, 289(4), 493–507. https://doi.org/10.1111/joim.13171
83. Rendimiento del antígeno carcinoembrionario como prueba diagnóstica del cancer colorrectal. (2021). REVISTA MEDICA DEL URUGUAY, 37(2). https://doi.org/10.29193/rmu.37.2.1
84. Tong, G. J., Zhang, G. Y., Liu, J., Zheng, Z. Z., Chen, Y., Niu, P. P., & Xu, X. T. (2018). Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. World journal of clinical oncology, 9(7), 148–161. https://doi.org/10.5306/wjco.v9.i7.148
85. Afanador, C. H., Palacio, K. A., Isaza, L. F., Ahumada, E., Ocampo, C. M., & Muñetón, C. M. (2022). Caracterización molecular de pacientes con cáncer colorrectal. Biomédica, 42(Sp. 1), 154–171. https://doi.org/10.7705/biomedica.5957
86. Huang, D., Sun, W., Zhou, Y., Li, P., Chen, F., Chen, H., Xia, D., Xu, E., Lai, M., Wu, Y., & Zhang, H. (2018). Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. Cancer and Metastasis Reviews, 37(1), 173–187. https://doi.org/10.1007/s10555-017-9726-5
87. Nowak, J. A., Yurgelun, M. B., Bruce, J. L., Rojas-Rudilla, V., Hall, D. L., Shivdasani, P., Garcia, E. P., Agoston, A. T., Srivastava, A., Ogino, S., Kuo, F. C., Lindeman, N. I., & Dong, F. (2017). Detection of Mismatch Repair Deficiency and Microsatellite Instability in Colorectal Adenocarcinoma by Targeted Next-Generation Sequencing. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 19(1), 84–91. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.07.010
88. Papke, D. J., Nowak, J. A., Yurgelun, M. B., Frieden, A., Srivastava, A., Lindeman, N. I., Sholl, L. M., MacConaill, L. E., & Dong, F. (2018). Validation of a targeted next-generation sequencing approach to detect mismatch repair deficiency in colorectal adenocarcinoma. ModernPathology, 31(12), 1882–1890. https://doi.org/10.1038/s41379-018-0091-x
89. Vaňková, B., Vaněček, T., Ptáková, N., Hájková, V., Dušek, M., Michal, M., ŠVajdler, P., Daum, O., Daumová, M., Michal, M., Mezencev, R., & ŠVajdler, M. (2020). Targeted next generation sequencing of MLH1 -deficient, MLH1 promoter hypermethylated, and BRAF / RAS -wild-type colorectal adenocarcinomas is effective in detecting tumors with actionable oncogenic gene fusions. Genes, Chromosomes and Cancer, 59(10), 562–568. https://doi.org/10.1002/gcc.22861
90. Carter, J. H., Cottrell, C. E., McNulty, S. N., Vigh-Conrad, K. A., Lamp, S., Heusel, J. W., & Duncavage, E. J. (2017). FGFR2 amplification in colorectal adenocarcinoma. Molecular Case Studies, 3(6), a001495. https://doi.org/10.1101/mcs.a001495
91. Li, P., Huang, T., Zou, Q., Liu, D., Wang, Y., Tan, X., Wei, Y., & Qiu, H. (2019). FGFR2 Promotes Expression of PD-L1 in Colorectal Cancer via the JAK/STAT3 Signaling Pathway. The Journal of Immunology, 202(10), 3065–3075. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801199
92. Ross, J. S., Fakih, M., Ali, S. M., Elvin, J. A., Schrock, A. B., Suh, J., Vergilio, J. A., Ramkissoon, S., Severson, E., Daniel, S., Fabrizio, D., Frampton, G., Sun, J., Miller, V. A., Stephens, P. J., & Gay, L. M. (2018). Targeting HER2 in colorectal cancer: The landscape of amplification and short variant mutations in ERBB2 and ERBB3. Cancer, 124(7), 1358–1373. https://doi.org/10.1002/cncr.31125
93. Lasota, J., Chłopek, M., Wasąg, B., Kowalik, A., Christiansen, J., Lamoureux, J., Kuźniacka, A., Felisiak-Gołąbek, A., Liu, Y., Reyes, T., Saha, R., Agaimy, A., Behenska, K., Biernat, W., Cattaneo, L., Centonze, G., Daum, O., Daumova, M., Domagała, P., Dziuba, I., … Miettinen, M. (2020). Colorectal Adenocarcinomas Harboring ALK Fusion Genes: A Clinicopathologic and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Molecular Genetic Study of 12 Cases and Review of the Literature. The American journal of surgical pathology, 44(9), 1224–1234. https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001512

94. Koduru, S. V., Tiwari, A. K., Hazard, S. W., Mahajan, M., & Ravnic, D. J. (2017). Exploration of small RNA-seq data for small non-coding RNAs in Human Colorectal Cancer. Journal of Genomics, 5, 16–31. https://doi.org/10.7150/jgen.18856
95. Chen, H., Xu, Z., & Liu, D. (2019). Small non-coding RNA and colorectal cancer. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 23(5), 3050–3057. https://doi.org/10.1111/jcmm.14209
96. Lim, L. C., & Lim, Y. M. (2018). Proteome Heterogeneity in Colorectal Cancer. Proteomics, 18(3-4), 10.1002/pmic.201700169. https://doi.org/10.1002/pmic.201700169
97. Alves Martins, B. A., de Bulhões, G. F., Cavalcanti, I. N., Martins, M. M., de Oliveira, P. G., & Martins, A. M. A. (2019). Biomarkers in Colorectal Cancer: The Role of Translational Proteomics Research. Frontiers in Oncology, 9. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01284
98. Corbo, C., Cevenini, A., & Salvatore, F. (2017). Biomarker discovery by proteomics-based approaches for early detection and personalized medicine in colorectal cancer. Proteomics.Clinical applications, 11(5-6), 10.1002/prca.201600072. https://doi.org/10.1002/prca.201600072
99. Serna, G., Ruiz-Pace, F., Cecchi, F., Fasani, R., Jimenez, J., Thyparambil, S., Landolfi, S., Elez, E., Vivancos, A., Hembrough, T., Tabernero, J., Dienstmann, R., & Nuciforo, P. (2019). Targeted multiplex proteomics for molecular prescreening and biomarker discovery in metastaticcolorectal cancer. Scientific Reports, 9(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-49867-7
100. Li, Q., Dai, J., Zhang, P., & Jiang, G. (2021). Management of Pulmonary Ground Glass Nodules: Less Is More. The Annals of Thoracic Surgery, 112(1), 1–2. https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2021.01.077
101. Miyoshi, T., Aokage, K., Wakabayashi, M., Shimoyama, R., Kataoka, T., Fukuda, H., & Watanabe, S. I. (2021). Prospective evaluation of watchful waiting for early-stage lung cancer with ground-glass opacity: a single-arm confirmatory multicenter study: Japan Clinical Oncology Group study JCOG1906 (EVERGREEN study). Japanese Journal of Clinical Oncology, 51(8), 1330–1333. https://doi.org/10.1093/jjco/hyab074.
102. Postmus, P., Kerr, K., Oudkerk, M., Senan, S., Waller, D., Vansteenkiste, J., Escriu, C., & Peters, S. (2017). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, 28, iv1-iv21. https://doi.org/10.1093/annonc/mdx222
103. Besse, B., Adjei, A., Baas, P., Meldgaard, P., Nicolson, M., Paz-Ares, L., Reck, M., Smit, E., Syrigos, K., Stahel, R., Felip, E., Peters, S., Stahel, R., Felip, E., Peters, S., Kerr, K., Besse, B., Vansteenkiste, J., Eberhardt, W., . . . Westeel, V. (2014). 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease. Annals of Oncology, 25(8), 1475–1484. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu123
104. Kerr, K., Bubendorf, L., Edelman, M., Marchetti, A., Mok, T., Novello, S., O'Byrne, K., Stahel, R., Peters, S., Felip, E., Stahel, R., Felip, E., Peters, S., Kerr, K., Besse, B., Vansteenkiste, J., Eberhardt, W., Edelman, M., Mok, T., . . . Westeel, V. (2014). Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. Annals of Oncology, 25(9), 1681–1690. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu145
105. Schrank, Z., Chhabra, G., Lin, L., Iderzorig, T., Osude, C., Khan, N., Kuckovic, A., Singh, S., Miller, R., & Puri, N. (2018). Current Molecular-Targeted Therapies in NSCLC and Their Mechanism of Resistance. Cancers, 10(7), 224. https://doi.org/10.3390/cancers10070224
106. Silva, M., Prokop, M., Jacobs, C., Capretti, G., Sverzellati, N., Ciompi, F., van Ginneken, B., Schaefer-Prokop, C. M., Galeone, C., Marchianò, A., & Pastorino, U. (2018). Long-Term Active Surveillance of Screening Detected Subsolid Nodules is a Safe Strategy to Reduce Overtreatment. Journal of Thoracic Oncology, 13(10), 1454–1463. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.06.013
107. Pastorino, U., Silva, M., Sestini, S., Sabia, F., Boeri, M., Cantarutti, A., Sverzellati, N., Sozzi, G., Corrao, G., & Marchianò, A. (2019). Prolonged lung cancer screening reduced 10-year mortality in the MILD trial: new confirmation of lung cancer screening efficacy. Annals of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 30(7), 1162–1169. https://doi.org/10.1093/annonc/mdz117

108. Pastorino, U., Sverzellati, N., Sestini, S., Silva, M., Sabia, F., Boeri, M., Cantarutti, A., Sozzi, G., Corrao, G., & Marchianò, A. (2019). Ten-year results of the Multicentric Italian Lung Detection trial demonstrate the safety and efficacy of biennial lung cancer screening. European Journal of Cancer, 118, 142–148. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.06.009
109. Payne, R. G., Anker, C. J., Sprague, B. L., No, H. J., Lin, S. H., & Lester-Coll, N. H. (2022). Active Surveillance for Early Stage Lung Cancer. Clinical lung cancer, 23(3), 226–235. https://doi.org/10.1016/j.cllc.2022.01.001
110. Ferguson, M. K. (2022). Atlas de Cirugía de Tórax (Primera edición). Amolca.
111. Gu, C., Wang, R., Pan, X., Huang, Q., Luo, J., Zheng, J., Wang, Y., Shi, J., & Chen, H. (2017). Comprehensive study of prognostic risk factors of patients underwent pneumonectomy. Journal of Cancer, 8(11), 2097–2103. https://doi.org/10.7150/jca.19454
112. Jones, G. S., & Baldwin, D. R. (2018). Recent advances in the management of lung cancer. Clinical medicine (London, England), 18(Suppl 2), s41–s46. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-2-s41
113. Hattori, A., Matsunaga, T., Takamochi, K., Oh, S., & Suzuki, K. (2018). Significance of Lymphadenectomy in Part-Solid Lung Adenocarcinoma: Propensity Score Matched Analysis. The Annals of Thoracic Surgery, 106(4), 989–997. https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.04.069
114. Yang, H. X., Woo, K. M., Sima, C. S., Bains, M. S., Adusumilli, P. S., Huang, J., Finley, D. J., Rizk, N. P., Rusch, V. W., Jones, D. R., & Park, B. J. (2017). Long-term Survival Based on the Surgical Approach to Lobectomy For Clinical Stage I Nonsmall Cell Lung Cancer: Comparison of Robotic, Video-assisted Thoracic Surgery, and Thoracotomy Lobectomy. Annals of surgery, 265(2), 431–437. https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001708
115. Casiragh, M. (2018). Ten Years' Experience in Robotic-Assisted Thoracic Surgery for Early Stage Lung Cancer. Thoracic and cardiovascular Surgeon, 7, 564-573. https://doi.org/10.1055/s- 0039-1698411
116. Novellis, P., Bottoni, E., Voulaz, E., Cariboni, U., Testori, A., Bertolaccini, L., Giordano, L., Dieci, E., Granato, L., Vanni, E., Montorsi, M., Alloisio, M., & Veronesi, G. (2018, febrero). Robotic surgery, video-assisted thoracic surgery, and open surgery for early stage lung cancer: comparison of costs and outcomes at a single institute. Journal of Thoracic Disease, 10(2), 790-798. https://doi.org/10.21037/jtd.2018.01.123
117. Terra, R. M., Leite, P., & Dela Vega, A. (2021). Global status of the robotic thoracic surgery. Journal of thoracic disease, 13(10), 6123–6128. https://doi.org/10.21037/jtd-19-3271
118. Vinod, S. K. (2015, abril). International Patterns of Radiotherapy Practice for Non–Small Cell Lung Cancer. Seminars in Radiation Oncology, 25(2), 143-150. https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2014.11.001
119. Vinod, S. K. & Hau, E. (2020, 9 junio). Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. Respirology, 25(S2), 61-71. https://doi.org/10.1111/resp.13870
120. Corso, C. D., Park, H. S., Moreno, A. C., Kim, A. W., Yu, J. B., Husain, Z. A. & Decker, R. H. (2017, agosto). Stage I Lung SBRT Clinical Practice Patterns. American Journal of Clinical Oncology, 40(4), 358-361. https://doi.org/10.1097/coc.0000000000000162
121. Nagata, Y. & Kimura, T. (2018, 7 abril). Stereotactic body radiotherapy (SBRT) for Stage I lung cancer. Japanese Journal of Clinical Oncology, 48(5), 405-409. https://doi.org/10.1093/jjco/hyy034
122. Menten, M. J., Wetscherek, A. & Fast, M. F. (2017, diciembre). MRI-guided lung SBRT: Present and future developments. Physica Medica, 44, 139-149. https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.02.003
123. Sebastian, N. T., Xu-Welliver, M. & Williams, T. M. (2018, agosto). Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early stage non-small cell lung cancer (NSCLC): contemporary insights and advances. Journal of Thoracic Disease, 10(S21), S2451-S2464. https://doi.org/10.21037/jtd.2018.04.52

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

124. Timmerman, R. D., Paulus, R., Pass, H. I., Gore, E. M., Edelman, M. J., Galvin, J., Straube, W. L., Nedzi, L. A., McGarry, R. C., Robinson, C. G., Schiff, P. B., Chang, G., Loo, B. W.,Bradley, J. D. & Choy, H. (2018, 1 septiembre). Stereotactic Body Radiation Therapy for Operable Early-Stage Lung Cancer. JAMA Oncology, 4(9), 1263. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.1251
125. Shinde, A., Li, R., Kim, J., Salgia, R., Hurria, A. & Amini, A. (2018, agosto). Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early-stage lung cancer in the elderly. Seminars in Oncology, 45(4), 210-219. https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.06.002
126. Kreinbrink, P., Blumenfeld, P., Tolekidis, G., Sen, N., Sher, D. & Marwaha, G. (2017, septiembre). Lung stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early-stage non-small cell lung cancer in the very elderly (≥ 80 years old): Extremely safe and effective. Journal of Geriatric Oncology, 8(5), 351-355. https://doi.org/10.1016/j.jgo.2017.07.002
127. Yoon, S. M., Shaikh, T. & Hallman, M. (2017). Therapeutic management options for stage III non-small cell lung cancer. World Journal of Clinical Oncology, 8(1), 1. https://doi.org/10.5306/wjco.v8.i1.1
128. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. PORT Meta-analysis Trialists Group. Lancet. 1998 Jul 25;352(9124):257-63. PMID: 9690404
129. Wang, K., Eblan, M. J., Deal, A. M., Lipner, M., Zagar, T. M., Wang, Y., Mavroidis, P., Lee, C. B., Jensen, B. C., Rosenman, J. G., Socinski, M. A., Stinchcombe, T. E. & Marks, L. B. (2017, 1 mayo). Cardiac Toxicity After Radiotherapy for Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer: Pooled Analysis of Dose-Escalation Trials Delivering 70 to 90 Gy. Journal of Clinical Oncology,35(13), 1387-1394. https://doi.org/10.1200/jco.2016.70.0229
130. Welsh, J., Menon, H., Chen, D., Verma, V., Tang, C., Altan, M., Hess, K., de Groot, P., Nguyen, Q. N., Varghese, R., Comeaux, N. I., Simon, G., Skoulidis, F., Chang, J. Y., Papdimitrakopoulou, V., Lin, S. H. & Heymach, J. V. (2020, octubre). Pembrolizumab with or without radiation therapy for metastatic non-small cell lung cancer: a randomized phase I/II trial. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 8(2), e001001. https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001001
131. Käsmann, L., Eze, C., Taugner, J., Roengvoraphoj, O., Dantes, M., Schmidt-Hegemann, N. S., Schiopu, S., Belka, C. & Manapov, F. (2020, 9 julio). Chemoradioimmunotherapy of inoperable stage III non-small cell lung cancer: immunological rationale and current clinical trials establishing a novel multimodal strategy. Radiation Oncology, 15(1). https://doi.org/10.1186/s13014-020-01595-3
132. Nikitas, J., Roach, M., Robinson, C., Bradley, J., Huang, J., Perkins, S., Tsien, C. & Abraham, C. (2020, marzo). Treatment of oligometastatic lung cancer with brain metastases using stereotactic radiosurgery (SRS) and stereotactic body radiation therapy (SBRT). Clinical and Translational Radiation Oncology, 21, 32-35. https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.12.001
133. Zheng, L., Wang, Y., Xu, Z., Yang, Q., Zhu, G., Liao, X. Y., Chen, X., Zhu, B., Duan, Y. & Sun, J. (2019, 30 abril). Concurrent EGFR-TKI and Thoracic Radiotherapy as First-Line Treatment for Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer Harboring EGFR Active Mutations. The Oncologist, 24(8), 1031-e612. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0285
134. U.S National Library of medicine. (2015, 3 febrero). ClinicalTrials.gov. Recuperado 9 de septiembre de 2022, de https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02353741
135. Qiu, B., Jiang, P., Ji, Z., Huo, X., Sun, H. & Wang, J. (2021, marzo). Brachytherapy for lung cancer. Brachytherapy, 20(2), 454-466. https://doi.org/10.1016/j.brachy.2020.11.009
136. Blumenthal, G. M., Bunn, P. A., Chaft, J. E., McCoach, C. E., Perez, E. A., Scagliotti, G. V., Carbone, D. P., Aerts, H. J., Aisner, D. L., Bergh, J., Berry, D. A., Jarkowski, A., Botwood, N., Cross, D. A., Diehn, M., Drezner, N. L., Doebele, R. C., Blakely, C. M., Eberhardt, W. E., . . . Kris, M. G. (2018, diciembre). Current Status and Future Perspectives on Neoadjuvant Therapy in Lung Cancer. Journal of Thoracic Oncology, 13(12), 1818-1831. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.09.017
137. Forde, P. M., Chaft, J. E., Smith, K. N., Anagnostou, V., Cottrell, T. R., Hellmann, M. D., Zahurak, M., Yang, S. C., Jones, D. R., Broderick, S., Battafarano, R. J., Velez, M. J.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rekhtman, N., Olah, Z., Naidoo, J., Marrone, K. A., Verde, F., Guo, H., Zhang, J., . . . Pardoll, D. M. (2018, 24 mayo). Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. New England Journal of Medicine, 378(21), 1976-1986. https://doi.org/10.1056/nejmoa1716078

138. Rusch, V. W., Chaft, J. E., Johnson, B., Wistuba, I. I., Kris, M. G., Lee, J. M., Bunn, P. A., Kwiatkowski, D. J., Reckamp, K. L., Finley, D. J., Haura, E. B., Waqar, S. N., Doebele, R. C., Garon, E. B., Blasberg, J., Nicholas, A., Schulze, K., Phan, S. C., Gandhi, M. & Carbone, D. P. (2018, 20 mayo). Neoadjuvant atezolizumab in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Initial results from a multicenter study (LCMC3). Journal of Clinical Oncology, 36(15_suppl), 8541-8541. https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.15_suppl.8541
139. Bott, M. J., Yang, S. C., Park, B. J., Adusumilli, P. S., Rusch, V. W., Isbell, J. M., Downey, R. J., Brahmer, J. R., Battafarano, R., Bush, E., Chaft, J., Forde, P. M., Jones, D. R. & Broderick, S. R. (2019, julio). Initial results of pulmonary resection after neoadjuvant nivolumab in patients with resectable non–small cell lung cancer. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 158(1), 269-276. https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.11.124
140. Yang, C. F. J., McSherry, F., Mayne, N. R., Wang, X., Berry, M. F., Tong, B., Harpole, D. H., D'Amico, T. A., Christensen, J. D., Ready, N. E. & Klapper, J. A. (2018, marzo). Surgical Outcomes After Neoadjuvant Chemotherapy and Ipilimumab for Non-Small Cell Lung Cancer. The Annals of Thoracic Surgery, 105(3), 924-929. https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.09.030
141. Forde, P. M., Spicer, J., Lu, S., Provencio, M., Mitsudomi, T., Awad, M. M., Felip, E., Broderick, S. R., Brahmer, J. R., Swanson, S. J., Kerr, K., Wang, C., Ciuleanu, T. E., Saylors, G.B., Tanaka, F., Ito, H., Chen, K. N., Liberman, M., Vokes, E. E., Taube, J. M., … CheckMate 816 Investigators (2022). Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. The New England journal of medicine, 386(21), 1973–1985. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202170.
142. Provencio, M., Nadal, E., Insa, A., García-Campelo, M. R., Casal-Rubio, J., Dómine, M.,Majem, M., Rodríguez-Abreu, D., Martínez-Martí, A., De Castro Carpeño, J., Cobo, M., López Vivanco, G., Del Barco, E., Bernabé Caro, R., Viñolas, N., Barneto Aranda, I., Viteri, S., Pereira, E., Royuela, A., Casarrubios, M., … Cruz-Bermúdez, A. (2020). Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. The Lancet. Oncology, 21(11), 1413–1422. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30453-8
143. Chaft, J. E., Oezkan, F., Kris, M. G., Bunn, P. A., Wistuba, I. I., Kwiatkowski, D. J., Owen, D. H., Tang, Y., Johnson, B. E., Lee, J. M., Lozanski, G., Pietrzak, M., Seweryn, M., Byun, W. Y., Schulze, K., Nicholas, A., Johnson, A., Grindheim, J., Hilz, S., Shames, D. S., … LCMC study investigators (2022). Neoadjuvant atezolizumab for resectable non-small cell lung cancer: an open-label, single-arm phase II trial. Nature medicine, 28(10), 2155–2161. https://doi.org/10.1038/s41591-022-01962-5
144. Uprety, D., Mandrekar, S. J., Wigle, D., Roden, A. C. & Adjei, A. A. (2020, agosto). Neoadjuvant Immunotherapy for NSCLC: Current Concepts and Future Approaches. Journal of Thoracic Oncology, 15(8), 1281-1297. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.05.020
145. Forde, P. M., Spicer, J., Lu, S., Provencio, M., Mitsudomi, T., Awad, M. M., Felip, E., Broderick, S., Brahmer, J., Swanson, S. J., Kerr, K., Wang, C., Saylors, G. B., Tanaka, F., Ito, H., Chen, K. N., Dorange, C., Cai, J., Fiore, J. & Girard, N. (2021, 1 julio). Abstract CT003: Nivolumab (NIVO) + platinum-doublet chemotherapy (chemo) vs chemo as neoadjuvant treatment (tx) for resectable (IB-IIIA) non-small cell lung cancer (NSCLC) in the phase 3 CheckMate 816 trial. Cancer Research, 81(13_Supplement), CT003-CT003. https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2021-ct003
146. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Non-Small Cell Lung Cancer. (2023, 17 febrero). National Comprehensive Cancer Network. Recuperado 20 de marzo de 2023, de https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1450
147. Eichhorn, F., Klotz, L. V., Bischoff, H., Thomas, M., Lasitschka, F., Winter, H., Hoffmann, H., & Eichhorn, M. E. (2019). Neoadjuvant anti-programmed Death-1 immunotherapy by

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pembrolizumab in resectable nodal positive stage II/IIIa non-small-cell lung cancer (NSCLC): the NEOMUN trial. BMC cancer, 19(1), 413. https://doi.org/10.1186/s12885-019-5624-2

148. Zhong, W. Z., Wang, Q., Mao, W. M., Xu, S. T., Wu, L., Wei, Y. C., Liu, Y. Y., Chen, C., Cheng, Y., Yin, R., Yang, F., Ren, S. X., Li, X. F., Li, J., Huang, C., Liu, Z. D., Xu, S., Chen, K. N., Xu, S. D., Liu, L. X., … Wu, Y. L. (2021). Gefitinib Versus Vinorelbine Plus Cisplatin as Adjuvant Treatment for Stage II-IIIA (N1-N2) EGFR-Mutant NSCLC: Final Overall Survival Analysis of CTONG1104 Phase III Trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 39(7), 713–722. https://doi.org/10.1200/JCO.20.01820

149. Zhong, W. Z., Wang, Q., Mao, W. M., Xu, S. T., Wu, L., Shen, Y., Liu, Y. Y., Chen, C., Cheng, Y., Xu, L., Wang, J., Fei, K., Li, X. F., Li, J., Huang, C., Liu, Z. D., Xu, S., Chen, K. N., Xu, S. D., Liu, L. X., … ADJUVANT investigators (2018). Gefitinib versus vinorelbine plus cisplatin as adjuvant treatment for stage II-IIIA (N1-N2) EGFR-mutant NSCLC (ADJUVANT/CTONG1104): a randomised, open-label, phase 3 study. The Lancet. Oncology, 19(1), 139–148. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30729-5

150. Wu, Y. L., Tsuboi, M., He, J., John, T., Grohe, C., Majem, M., Goldman, J. W., Laktionov, K., Kim, S. W., Kato, T., Vu, H. V., Lu, S., Lee, K. Y., Akewanlop, C., Yu, C. J., de Marinis, F., Bonanno, L., Domine, M., Shepherd, F. A., Zeng, L., … ADAURA Investigators (2020). Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine, 383(18), 1711–1723. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027071

151. Center for Drug Evaluation and Research. (2020, 18 diciembre). FDA approves osimertinib as adjuvant therapy for non-small cell lung cancer with EGFR mutations. U.S. Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-osimertinib-adjuvant-therapy-non-small-cell-lung-cancer-egfr-mutations

152. Felip, E., Altorki, N., Zhou, C., Csőszi, T., Vynnychenko, I., Goloborodko, O., Luft, A., Akopov, A., Martinez-Marti, A., Kenmotsu, H., Chen, Y. M., Chella, A., Sugawara, S., Voong, D., Wu, F., Yi, J., Deng, Y., McCleland, M., Bennett, E., . . . Wakelee, H. (2021, octubre). Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. The Lancet, 398(10308), 1344-1357. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02098-5

153. Center for Drug Evaluation and Research. (2023, 23 enero). FDA approves atezolizumab as adjuvant treatment for non-small cell lung cancer. U.S. Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-atezolizumab-adjuvant-treatment-non-small-cell-lung-cancer

154. Tagrisso approved in the EU for the adjuvant treatment of patients with early-stage EGFR- mutated lung cancer. News release. AstraZeneca. May 28, 2021. Recuperado el 8 de Abril de, 2023. https://bit.ly/2RKhYM5

155. Tecentriq. (2023, 7 marzo). European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecentriq

156. Majem, M., Hernández-Hernández, J., Hernando-Trancho, F., Rodríguez de Dios, N., Sotoca, A., Trujillo-Reyes, J. C., Vollmer, I., Delgado-Bolton, R. & Provencio, M. (2019, 6 junio). Multidisciplinary consensus statement on the clinical management of patients with stage III non-small cell lung cancer. Clinical and Translational Oncology, 22(1), 21-36. https://doi.org/10.1007/s12094-019-02134-7

157. Aupérin, A., Le Péchoux, C., Rolland, E., Curran, W. J., Furuse, K., Fournel, P., Belderbos, J., Clamon, G., Ulutin, H. C., Paulus, R., Yamanaka, T., Bozonnat, M. C., Uitterhoeve, A., Wang, X., Stewart, L., Arriagada, R., Burdett, S., & Pignon, J. P. (2010). Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 28(13), 2181–2190. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.2543

158. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, Yokoi T, Chiappori A, Lee KH, de Wit M, Cho BC, Bourhaba M, Quantin X, Tokito T, Mekhail T, Planchard D, Kim YC, Karapetis CS, Hiret S, Ostoros G, Kubota K, Gray JE, Paz-Ares L, de Castro Carpeño J, Wadsworth C, Melillo G, Jiang H, Huang Y, Dennis PA, Özgüroğlu M; PACIFIC Investigators.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2017 Nov 16;377(20):1919-1929. doi: 10.1056/NEJMoa1709937. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28885881.

159. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, Vicente D, Planchard D, Paz-Ares L, Vansteenkiste JF, Garassino MC, Hui R, Quantin X, Rimner A, Wu YL, Özgüroğlu M, Lee KH, Kato T, de Wit M, Kurata T, Reck M, Cho BC, Senan S, Naidoo J, Mann H, Newton M, Thiyagarajah P, Antonia SJ. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 2022 Apr 20;40(12):1301-1311. doi: 10.1200/JCO.21.01308. Epub 2022 Feb 2. Erratum in: J Clin Oncol. 2022 Jun 10;40(17):1965. PMID: 35108059; PMCID: PMC9015199
160. Raez, L. E., Arrieta, O., Chamorro, D. F., Soberanis-Piña, P. D., Corrales, L., Martín, C., Cuello, M., Samtani, S., Recondo, G., Mas, L., Zatarain-Barrón, Z. L., Ruíz-Patiño, A., García-Robledo, J. E., Ordoñez-Reyes, C., Jaller, E., Dickson, F., Rojas, L., Rolfo, C., Rosell, R., & Cardona, A. F. (2022). Durvalumab After Chemoradiation for Unresectable Stage III Non-Small Cell Lung Cancer: Inferior Outcomes and Lack of Health Equity in Hispanic Patients Treated With PACIFIC Protocol (LA1-CLICaP). Frontiers in oncology, 12, 904800. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.904800
161. Remon, J., Levy, A., Singh, P., Hendriks, L., Aldea, M., & Arrieta, O. (2022). Current challenges of unresectable stage III NSCLC: are we ready to break the glass ceiling of the PACIFIC trial?. Therapeutic advances in medical oncology, 14, 17588359221113268. https://doi.org/10.1177/17588359221113268
162. De Ruysscher, D., Ramalingam, S., Urbanic, J., Gerber, D. E., Tan, D., Cai, J., Li, A., & Peters, S. (2022). CheckMate 73L: A Phase 3 Study Comparing Nivolumab Plus Concurrent Chemoradiotherapy Followed by Nivolumab With or Without Ipilimumab Versus Concurrent Chemoradiotherapy Followed by Durvalumab for Previously Untreated, Locally Advanced Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. Clinical lung cancer, 23(3), e264–e268. https://doi.org/10.1016/j.cllc.2021.07.005
163. Peters, S., Felip, E., Dafni, U., Belka, C., Guckenberger, M., Irigoyen, A., Nadal, E., Becker, A., Vees, H., Pless, M., Martinez-Marti, A., Tufman, A., Lambrecht, M., Andratschke, N., Piguet, A., Kassapian, M., Roschitzki-Voser, H., Rabaglio-Poretti, M., Stahel, R., . . . De Ruysscher, D. (2019, julio). Safety evaluation of nivolumab added concurrently to radiotherapy in a standard first line chemo-radiotherapy regimen in stage III non-small cell lung cancer—The ETOP NICOLAS trial. Lung Cancer, 133, 83-87. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.05.001
164. Besse, B., Adjei, A., Baas, P., Meldgaard, P., Nicolson, M., Paz-Ares, L., Reck, M., Smit, E., Syrigos, K., Stahel, R., Felip, E., Peters, S., Stahel, R., Felip, E., Peters, S., Kerr, K., Besse, B., Vansteenkiste, J., Eberhardt, W., . . . Westeel, V. (2014, agosto). 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease. Annals of Oncology, 25(8), 1475-1484. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu123
165. Lima, J. P. D. S. N., Santos, L. V. D., Sasse, E. C. & Sasse, A. D. (2009, marzo). Optimal duration of first-line chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: A systematicreview with meta-analysis. European Journal of Cancer, 45(4), 601-607. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.11.006
166. Maguire, F. B., Morris, C. R., Parikh-Patel, A., Cress, R. D., Keegan, T. H., Li, C. S., Lin, P. S., & Kizer, K. W. (2019). Disparities in Systemic Treatment Use in Advanced-stage Non–Small Cell Lung Cancer by Source of Health Insurance. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 28(6), 1059-1066. https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-18-0823
167. Patel, A., Cress, R. D., Keegan, T. H. M., Li, C. S., Lin, P. S. & Kizer, K. W. (2019, 4 abril). First-Line Systemic Treatments for Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer in California: Patterns of Care and Outcomes in a Real-World Setting. JNCI Cancer Spectrum, 3(3). https://doi.org/10.1093/jncics/pkz020
168. Wen, M., Xia, J., Sun, Y., Wang, X., Fu, X., Zhang, Y., Zhang, Z., Zhou, Y., & Li, X. (2018). Combination of EGFR-TKIs with chemotherapy versus chemotherapy or EGFR-TKIs alone in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

advanced NSCLC patients with EGFR mutation. Biologics : targets & therapy, 12, 183–190. https://doi.org/10.2147/BTT.S169305

169. Peng, L., Lu, D., Xia, Y., Hong, S., Selvaggi, G., Stebbing, J., Sun, Y. & Liang, F. (2021, 8 noviembre). Efficacy and Safety of First-Line Treatment Strategies for Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: A Bayesian Network Meta-Analysis. Frontiers in Oncology, 11. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.754768
170. Fukui, T., Tachihara, M., Nagano, T., & Kobayashi, K. (2022). Review of Therapeutic Strategies for Anaplastic Lymphoma Kinase-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. Cancers, 14(5), 1184. https://doi.org/10.3390/cancers14051184
171. Soria, J. C., Tan, D. S. W., Chiari, R., Wu, Y. L., Paz-Ares, L., Wolf, J., Geater, S. L., Orlov, S., Cortinovis, D., Yu, C. J., Hochmair, M., Cortot, A. B., Tsai, C. M., Moro-Sibilot, D., Campelo, R. G., McCulloch, T., Sen, P., Dugan, M., Pantano, S., . . . de Castro, G. (2017, marzo). First- line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK -rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. The Lancet, 389(10072), 917-929. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30123-x
172. Chen, J. A. & Riess, J. W. (2020, 25 junio). Optimal Management of Patients with Advanced NSCLC Harboring High PD-L1 Expression and Driver Mutations. Current Treatment Options in Oncology, 21(7). https://doi.org/10.1007/s11864-020-00750-y
173. Cascetta, P., Sforza, V., Manzo, A., Carillio, G., Palumbo, G., Esposito, G., Montanino, A., Costanzo, R., Sandomenico, C., De Cecio, R., Piccirillo, M. C., La Manna, C., Totaro, G., Muto, P., Picone, C., Bianco, R., Normanno, N., & Morabito, A. (2021). RET Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer. Cancers, 13(17), 4415. https://doi.org/10.3390/cancers13174415
174. Center for Drug Evaluation and Research. (2017, 22 junio). FDA grants regular approval to dabrafenib and trametinib combination for metastatic NSCLC with BRAF V600E mutation. U.S. Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-regular-approval-dabrafenib-and-trametinib-combination-metastatic-nsclc-braf-v600e
175. de Langen, A. J. & Smit, E. F. (2016, 3 octubre). Therapeutic approach to treating patients with BRAF-mutant lung cancer: latest evidence and clinical implications. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 9(1), 46-58. https://doi.org/10.1177/1758834016670555
176. Salgia, R., Pharaon, R., Mambetsariev, I., Nam, A. & Sattler, M. (2021, enero). The improbable targeted therapy: KRAS as an emerging target in non-small cell lung cancer (NSCLC). Cell Reports Medicine, 2(1), 100186. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100186
177. Drilon, A., Tan, D. S. W., Lassen, U. N., Leyvraz, S., Liu, Y., Patel, J. D., Rosen, L., Solomon, B., Norenberg, R., Dima, L., Brega, N., Shen, L., Moreno, V., Kummar, S. & Lin, J. J. (2022, mayo). Efficacy and Safety of Larotrectinib in Patients With Tropomyosin Receptor Kinase Fusion–Positive Lung Cancers. JCO Precision Oncology, 6. https://doi.org/10.1200/po.21.00418
178. Comisión Permanente de Farmacia. (2022, 12 agosto). Informe de Posicionamiento Terapéutico de entrectinib (Rozlytrek®) en cáncer de pulmón no microcítico ROS1-positivo. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Recuperado 15 de septiembre de 2022, de https://www.aemps.gob.es/informa/informes-de-posicionamiento-terapeutico/informe-de-posicionamiento-terapeutico-de-entrectinib-rozlytrek-en-cancer-de-pulmon-no-microcitico-ros1-positivo/
179. Shepherd, F. A., Dancey, J., Ramlau, R., Mattson, K., Gralla, R., O'Rourke, M., Levitan, N., Gressot, L., Vincent, M., Burkes, R., Coughlin, S., Kim, Y. & Berille, J. (2000, 10 mayo). Prospective Randomized Trial of Docetaxel Versus Best Supportive Care in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Platinum-Based Chemotherapy. Journal of Clinical Oncology, 18(10), 2095-2103. https://doi.org/10.1200/jco.2000.18.10.2095
180. Moskovitz, M., Dudnik, E., Shamai, S., Rotenberg, Y., Popovich-Hadari, N., Wollner, M., Zer, A., Gottfried, M., Mishaeli, M., Rosenberg, S. K., Onn, A., Merimsky, O., Urban, D., Peled, N., Maimon, N. & Bar, J. (2022, 1 enero). ALK Inhibitors or Chemotherapy for Third Line in ALK-positive NSCLC? Real-world Data. The Oncologist, 27(1), e76-e84. https://doi.org/10.1093/oncolo/oyab005

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

181. U.S National Library of medicine. (2023, 29 enero). ClinicalTrials.gov. Recuperado 20 de septiembre de 2022, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/
182. Seymour, L., Bogaerts, J., Perrone, A., Ford, R., Schwartz, L. H., Mandrekar, S., Lin, N. U., Litière, S., Dancey, J., Chen, A., Hodi, F. S., Therasse, P., Hoekstra, O. S., Shankar, L. K., Wolchok, J. D., Ballinger, M., Caramella, C., de Vries, E., & RECIST working group (2017). iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. The Lancet. Oncology, 18(3), e143–e152. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30074-8
183. Villar Álvarez, F., Muguruza Trueba, I. & Vicente Antunes, S. I. (2016). Apuntes sobre recidivas y segundos tumores en el cáncer de pulmón. Archivos de Bronconeumología, 52(11), 545-546. https://doi.org/10.1016/j.arbres.2016.03.004
184. Cowling T, Loshak H. An Overview of Liquid Biopsy for Screening and Early Detection of Cancer. 2019 Nov 1. In: CADTH Issues in Emerging Health Technologies. Ottawa (ON):Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2016-. 179. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555478/
185. Santarpia, M., Liguori, A., D'Aveni, A., Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Daffinà, M. G., Lazzari, C., Altavilla, G., & Rosell, R. (2018). Liquid biopsy for lung cancer early detection. Journal of thoracic disease, 10(Suppl 7), S882–S897. https://doi.org/10.21037/jtd.2018.03.81
186. Min, H. Y., & Lee, H. Y. (2021). Mechanisms of resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer. Archives of pharmacal research, 44(2), 146–164. https://doi.org/10.1007/s12272-021-01312-y
187. Sosa Iglesias, V., Giuranno, L., Dubois, L. J., Theys, J. & Vooijs, M. (2018). Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Potential for NOTCH Targeting? Frontiers in Oncology, 8. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00267
188. Liang, J., Lu, T., Chen, Z., Zhan, C., & Wang, Q. (2019). Mechanisms of resistance to pemetrexed in non-small cell lung cancer. Translational lung cancer research, 8(6), 1107–1118. https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.10.14
189. Chawsheen, M. A. & Dash, P. R. (2021). mTOR modulates resistance to gemcitabine in lung cancer in an MTORC2 dependent mechanism. Cellular Signalling, 81, 109934. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109934
190. Wang, F., Wang, S. & Zhou, Q. (2020). The Resistance Mechanisms of Lung Cancer Immunotherapy. Frontiers in Oncology, 10. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.568059
191. Chae, Y. K., Oh, M. S., & Giles, F. J. (2018). Molecular Biomarkers of Primary and Acquired Resistance to T-Cell-Mediated Immunotherapy in Cancer: Landscape, Clinical Implications, and Future Directions. The oncologist, 23(4), 410–421. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0354
192. Mazieres, J., Drilon, A., Lusque, A., Mhanna, L., Cortot, A. B., Mezquita, L., Thai, A. A., Mascaux, C., Couraud, S., Veillon, R., Van den Heuvel, M., Neal, J., Peled, N., Früh, M., Ng, T. L., Gounant, V., Popat, S., Diebold, J., Sabari, J., Zhu, V. W., … Gautschi, O. (2019). Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry. Annals of oncology : official journal of theEuropean Society for Medical Oncology, 30(8), 1321–1328. https://doi.org/10.1093/annonc/mdz167
193. Takeda, K., Nakayama, M., Hayakawa, Y., Kojima, Y., Ikeda, H., Imai, N., Ogasawara, K., Okumura, K., Thomas, D. M., & Smyth, M. J. (2017). IFN-γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. Nature communications, 8, 14607. https://doi.org/10.1038/ncomms14607
194. Runciman Gozzer, T. & Carracedo Gonzáles, C. (2018). Resistencia adquirida a inhibidores de tirosina kinasa de tercera generación en cáncer de pulmón de células no pequeñas. Anales de la Facultad de Medicina, 79(4), 327. https://doi.org/10.15381/anales.v79i4.15639
195. Fukui, T., Tachihara, M., Nagano, T. & Kobayashi, K. (2022). Review of Therapeutic Strategies for Anaplastic Lymphoma Kinase-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. Cancers, 14(5), 1184. https://doi.org/10.3390/cancers14051184

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

196. Cascetta, P., Sforza, V., Manzo, A., Carillio, G., Palumbo, G., Esposito, G., Montanino, A., Costanzo, R., Sandomenico, C., De Cecio, R., Piccirillo, M. C., La Manna, C., Totaro, G., Muto, P., Picone, C., Bianco, R., Normanno, N. & Morabito, A. (2021). RET Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer. Cancers, 13(17), 4415. https://doi.org/10.3390/cancers13174415
197. de Langen, A. J. & Smit, E. F. (2016). Therapeutic approach to treating patients with BRAF-mutant lung cancer: latest evidence and clinical implications. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 9(1), 46-58. https://doi.org/10.1177/1758834016670555
198. Salgia, R., Pharaon, R., Mambetsariev, I., Nam, A. & Sattler, M. (2021). The improbable targeted therapy: KRAS as an emerging target in non-small cell lung cancer (NSCLC). Cell Reports Medicine, 2(1), 100186. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100186
199. Hashiguchi, Y., Muro, K., Saito, Y., Ito, Y., Ajioka, Y., Hamaguchi, T., Hasegawa, K., Hotta, K., Ishida, H., Ishiguro, M., Ishihara, S., Kanemitsu, Y., Kinugasa, Y., Murofushi, K., Nakajima, T. E., Oka, S., Tanaka, T., Taniguchi, H., Tsuji, A., . . . Sugihara, K. (2019). Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer. International Journal of Clinical Oncology, 25(1), 1-42. https://doi.org/10.1007/s10147-019-01485-z
200. Capdevila, J., Gómez, M. A., Guillot, M., Páez, D., Pericay, C., Safont, M. J., Tarazona, N., Vera, R., Vidal, J. & Sastre, J. (2022). Correction to: SEOM-GEMCAD-TTD clinical guidelines for localized rectal cancer (2021). Clinical and Translational Oncology, 24(7), 1443-1444. https://doi.org/10.1007/s12094-022-02855-2
201. Buccafusca, G., Proserpio, I., Tralongo, A. C., Rametta Giuliano, S. & Tralongo, P. (2019). Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 136, 20-30. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.01.023
202. López-Campos, F., Martín-Martín, M., Fornell-Pérez, R., García-Pérez, J. C., Die-Trill, J., Fuentes-Mateos, R., López-Durán, S., Domínguez-Rullán, J., Ferreiro, R., Riquelme-Oliveira, A., Hervás-Morón, A., & Couñago, F. (2020). Watch and wait approach in rectal cancer: Current controversies and future directions. World journal of gastroenterology, 26(29), 4218–4239. https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i29.4218
203. Costas-Chavarri, A., Nandakumar, G., Temin, S., Lopes, G., Cervantes, A., Cruz Correa, M., Engineer, R., Hamashima, C., Ho, G. F., Huitzil, F. D., Malekzadeh Moghani, M., Sharara, A. I., Stern, M. C., Teh, C., Vázquez Manjarrez, S. E., Verjee, A., Yantiss, R. & Shah, M. A. (2019). Treatment of Patients With Early-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. Journal of Global Oncology, 5, 1-19. https://doi.org/10.1200/jgo.18.00214
204. Kaiser, A. M., Kang, J. C., Chan, L. S., Vukasin, P., & Beart, R. W., Jr (2004). Laparoscopic-assisted vs. open colectomy for colon cancer: a prospective randomized trial. Journal of laparoendoscopic & advanced surgical techniques. Part A, 14(6), 329–334. https://doi.org/10.1089/lap.2004.14.329
205. Garcia-Aguilar, J., Renfro, L. A., Chow, O. S., Shi, Q., Carrero, X. W., Lynn, P. B., Thomas, C. R., Jr, Chan, E., Cataldo, P. A., Marcet, J. E., Medich, D. S., Johnson, C. S., Oommen, S. C., Wolff, B. G., Pigazzi, A., McNevin, S. M., Pons, R. K., & Bleday, R. (2015). Organ preservation for clinical T2N0 distal rectal cancer using neoadjuvant chemoradiotherapy and local excision (ACOSOG Z6041): results of an open-label, single-arm, multi-institutional, phase 2 trial. The Lancet. Oncology, 16(15), 1537–1546. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00215-6
206. Fundación MM & Oncosur. (2007). DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO Carcinoma Colorrectal [Conjunto de datos]. Fundación Médica Mutua Madrileña.
207. Gómez-España, M. A., Gallego, J., González-Flores, E., Maurel, J., Páez, D., Sastre, J., Aparicio, J., Benavides, M., Feliu, J. & Vera, R. (2018). SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer (2018). Clinical and Translational Oncology, 21(1),46-54. https://doi.org/10.1007/s12094-018-02002-w
208. Morris, V. K., Kennedy, E. B., Baxter, N. N., Benson, A. B., Cercek, A., Cho, M., Ciombor, K. K., Cremolini, C., Davis, A., Deming, D. A., Fakih, M. G., Gholami, S., Hong, T. S., Jaiyesimi, I., Klute, K., Lieu, C., Sanoff, H., Strickler, J. H., White, S., . . . Eng, C. (2022). Treatment of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. Journal of Clinical Oncology. https://doi.org/10.1200/jco.22.01690

209. Habr-Gama, A., Perez, R. O., Nadalin, W., Sabbaga, J., Ribeiro, U., Jr, Silva e Sousa, A. H., Jr, Campos, F. G., Kiss, D. R., & Gama-Rodrigues, J. (2004). Operative versus nonoperativetreatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. Annals of surgery, 240(4), 711–718. https://doi.org/10.1097/01.sla.0000141194.27992.32

210. Maas, M., Beets-Tan, R. G., Lambregts, D. M., Lammering, G., Nelemans, P. J., Engelen, S. M., van Dam, R. M., Jansen, R. L., Sosef, M., Leijtens, J. W., Hulsewé, K. W., Buijsen, J., & Beets, G. L. (2011). Wait-and-see policy for clinical complete responders after chemoradiation for rectal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 29(35), 4633–4640. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.7176

211. Renehan, A. G., Malcomson, L., Emsley, R., Gollins, S., Maw, A., Myint, A. S., Rooney, P. S., Susnerwala, S., Blower, A., Saunders, M. P., Wilson, M. S., Scott, N., & O'Dwyer, S. T. (2016). Watch-and-wait approach versus surgical resection after chemoradiotherapy for patients with rectal cancer (the OnCoRe project): a propensity-score matched cohort analysis. The Lancet. Oncology, 17(2), 174–183. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00467-2

212. Smith, J. J., Strombom, P., Chow, O. S., Roxburgh, C. S., Lynn, P., Eaton, A., Widmar, M., Ganesh, K., Yaeger, R., Cercek, A., Weiser, M. R., Nash, G. M., Guillem, J. G., Temple, L. K. F., Chalasani, S. B., Fuqua, J. L., Petkovska, I., Wu, A. J., Reyngold, M., . . . Paty, P. B. (2019). Assessment of a Watch-and-Wait Strategy for Rectal Cancer in Patients With a Complete Response After Neoadjuvant Therapy. JAMA Oncology, 5(4), e185896. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.5896

213. Wang, Q. X., Zhang, R., Xiao, W. W., Zhang, S., Wei, M. B., Li, Y. H., Chang, H., Xie, W. H., Li, L. R., Ding, P. R., Chen, G., Zeng, Z. F., Wang, W. H., Wan, X. B. & Gao, Y. H. (2021). The watch-and-wait strategy versus surgical resection for rectal cancer patients with a clinical complete response after neoadjuvant chemoradiotherapy. Radiation Oncology, 16(1). https://doi.org/10.1186/s13014-021-01746-0.

214. Matsuda, T., Yamashita, K., Hasegawa, H., Oshikiri, T., Hosono, M., Higashino, N., Yamamoto, M., Matsuda, Y., Kanaji, S., Nakamura, T., Suzuki, S., Sumi, Y., & Kakeji, Y. (2018). Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. Annals of gastroenterological surgery,2(2), 129–136. https://doi.org/10.1002/ags3.12061

215. Smits, L. J., van Lieshout, A. S., Grüter, A. A., Horsthuis, K. & Tuynman, J. B. (2022). Multidisciplinary management of early rectal cancer – The role of surgical local excision in current and future clinical practice. Surgical Oncology, 40, 101687. https://doi.org/10.1016/j.suronc.2021.101687

216. Gómez-Sánchez, J., Zurita-Saavedra, M., González-Callejas, C., de Castro-Monedero, P., Cabrerizo-Fernández, M. J., Garde-Lecumberri, C., González-Puga, C., Gutiérrez-Sainz, J. & Mirón-Pozo, B. (2019). Current surgical techniques in rectal cancer. ACTUALIDAD MEDICA, 104(808), 175-181. https://doi.org/10.15568/am.2019.808.re01

217. The American Cancer Society. (2020). Treating Colorectal Cancer [Conjunto de datos].

218. Kaltenbach, T., Anderson, J. C., Burke, C. A., Dominitz, J. A., Gupta, S., Lieberman, D., Robertson, D. J., Shaukat, A., Syngal, S. & Rex, D. K. (2020). Endoscopic Removal of Colorectal Lesions—Recommendations by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Gastrointestinal Endoscopy, 91(3), 486-519. https://doi.org/10.1016/j.gie.2020.01.029

219. Santiesteban, L. T. F., Álvarez, F. E. H., Villalonga, J. A. G., Pérez, M. L. & Meisozo, M. G. (2020). Resultados del tratamiento quirúrgico en pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Revista Cubana de Cirugía, 59(2). http://scielo.sld.cu/pdf/cir/v59n2/1561-2945-cir-59-02-e935.pdf

220. Yang, K. M., Park, I. J., Lee, J. L., Kim, C. W., Yoon, Y. S., Lim, S. B., Yu, C. S. & Kim, J. C. (2020). Benefits of repeated resections for liver and lung metastases from colorectal cancer. Asian Journal of Surgery, 43(1), 102-109. https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2019.03.002

221. Smits, L. J., van Lieshout, A. S., Grüter, A. A., Horsthuis, K., & Tuynman, J. B. (2022). Multidisciplinary management of early rectal cancer – The role of surgical local excision in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

current and future clinical practice. Surgical Oncology, 40, 101687. https://doi.org/10.1016/j.suronc.2021.101687

222. Abraha, I., Aristei, C., Palumbo, I., Lupattelli, M., Trastulli, S., Cirocchi, R., De Florio, R., & Valentini, V. (2018). Preoperative radiotherapy and curative surgery for the management of localised rectal carcinoma. The Cochrane database of systematic reviews, 10(10), CD002102. https://doi.org/10.1002/14651858.CD002102.pub3
223. Suppiah, A., Hartley, J. E., & Monson, J. R. (2009). Advances in radiotherapy in operable rectal cancer. Digestive surgery, 26(3), 187–199. https://doi.org/10.1159/000219931
224. Sauer, R., Becker, H., Hohenberger, W., Rödel, C., Wittekind, C., Fietkau, R., Martus, P., Tschmelitsch, J., Hager, E., Hess, C. F., Karstens, J. H., Liersch, T., Schmidberger, H., Raab, R., & German Rectal Cancer Study Group (2004). Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. The New England journal of medicine, 351(17), 1731– 1740. https://doi.org/10.1056/NEJMoa040694
225. Aschele, C., Cionini, L., Lonardi, S., Pinto, C., Cordio, S., Rosati, G., Artale, S., Tagliagambe, A., Ambrosini, G., Rosetti, P., Bonetti, A., Negru, M. E., Tronconi, M. C., Luppi, G., Silvano,G., Corsi, D. C., Bochicchio, A. M., Chiaulon, G., Gallo, M., & Boni, L. (2011). Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 29(20), 2773–2780. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.4911
226. François, E., Azria, D., Gourgou-Bourgade, S., Jarlier, M., Martel-Laffay, I., Hennequin, C., Etienne, P. L., Vendrely, V., Seitz, J. F., Conroy, T., Juzyna, B., & Gerard, J. P. (2014). Results in the elderly with locally advanced rectal cancer from the ACCOR12/PRODIGE 2 phase III trial: tolerance and efficacy. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 110(1), 144–149. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.10.019
227. Wang, Y., Shen, L., Wan, J., Zhang, H., Wu, R., Wang, J., Wang, Y., Xu, Y., Cai, S., Zhang, Z., & Xia, F. (2022). Neoadjuvant chemoradiotherapy combined with immunotherapy for locally advanced rectal cancer: A new era for anal preservation. Frontiers in immunology, 13, 1067036. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1067036
228. Tam, S. Y., & Wu, V. W. C. (2019). A Review on the Special Radiotherapy Techniques of Colorectal Cancer. Frontiers in oncology, 9, 208. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00208
229. Gómez-España, M. A., Gallego, J., González-Flores, E., Maurel, J., Páez, D., Sastre, J., Aparicio, J., Benavides, M., Feliu, J., & Vera, R. (2018). SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer (2018). Clinical and Translational Oncology, 21(1),46-54. https://doi.org/10.1007/s12094-018-02002-w
230. Ji, X., Zhao, Y., Zhu, X., Shen, Z., Li, A., Chen, C., & Chu, X. (2021). Outcomes of Stereotactic Body Radiotherapy for Metastatic Colorectal Cancer With Oligometastases, Oligoprogression, or Local Control of Dominant Tumors. Frontiers in Oncology, 10. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.595781
231. Argiles, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., Laurent-Puig, P., Quirke, P., Yoshino, T., Taieb, J., Siena, S., & Arnold, D. L. (2020). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, 31(10), 1291-1305. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022
232. Farhat, W., Azzaza, M., Mizouni, A., Ammar, H., Ltaifa, M. B., Lagha, S., Kahloul, M., Gupta, R., Mabrouk, M., & Ali, A. B. (2019). Factors predicting recurrence after curative resection for rectal cancer: a 16-year study. World Journal of Surgical Oncology, 17(1). https://doi.org/10.1186/s12957-019-1718-1
233. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Rectal Cancer. (2023, 29 marzo). National Comprehensive Cancer Network. Recuperado 13 de abril de 2023, de https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1450

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

234. Zhu, J., Zeng, W., Ge, L., Yang, X., Wang, Q., & Wang, H. (2019). Capecitabine versus 5-fluorouracil in neoadjuvant chemoradiotherapy of locally advanced rectal cancer: A meta-analysis. Medicine, 98(17), e15241. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000015241
235. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Colon Cancer. (2023, 29 marzo). National Comprehensive Cancer Network. Recuperado 13 de abril de 2023, de https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1450
236. Maurel, J., Pedrosa, L., & Camps, J. (2019). Controversia en neoadyuvancia y cáncer de recto. Cirugia Espanola. https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2019.01.004
237. Hong, Y. S., Kim, S. Y., Lee, J. S., Nam, B. H., Kim, K. P., Kim, J. E., Park, Y. S., Park, J. O., Baek, J. Y., Kim, T. Y., Lee, K. W., Ahn, J. B., Lim, S. B., Yu, C. S., Kim, J. C., Yun, S. H., Kim, J. H., Park, J. H., Park, H. C., Jung, K. H., … Kim, T. W. (2019). Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy for Rectal Cancer After Preoperative Chemoradiotherapy (ADORE): Long-Term Results of a Randomized Controlled Trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 37(33), 3111–3123. https://doi.org/10.1200/JCO.19.00016
238. mFOLFOXIRI Versus mFOLFOX6 as Adjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. (s. f.). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04338191
239. Sahin, I., Ciombor, K. K., Diaz, L. A., Yu, J. B., & Kim, R. B. (2022). Immunotherapy for Microsatellite Stable Colorectal Cancers: Challenges and Novel Therapeutic Avenues. American Society of Clinical Oncology educational book, 42, 242-253. https://doi.org/10.1200/edbk_349811
240. Afanador, C. H., Palacio, K. A., Isaza, L. F., Ahumada, E., Ocampo, C. M., & Muñetón, C. M. (2022). Molecular characterization of colorectal cancer patients. Caracterización molecular de pacientes con cáncer colorrectal. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud, 42(Sp. 1), 154–171. https://doi.org/10.7705/biomedica.5957
241. Verschoor, Y., Van Den Berg, J. G., Beets, G. L., Sikorska, K., Aalbers, A. G. J., Van Lent, A. U., Grootscholten, C., Huibregtse, I., Marsman, H. A., Oosterling, S. J., Van De Belt, M., Kok, M., Schumacher, T. N., Van Leerdam, M. E., Haanen, J. B. A. G., Voest, E. E., & Chalabi, M. (2022). Neoadjuvant nivolumab, ipilimumab, and celecoxib in MMR-proficient and MMR-deficient colon cancers: Final clinical analysis of the NICHE study. Journal of Clinical Oncology, 40(16_suppl), 3511. https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.3511
242. Hu, H., Kang, L., Zhang, J., Wu, Z., Wang, H., Huang, M., Lan, P., Wu, X., Wang, C., Cao, W., Hu, J., Huang, Y., Huang, L., Wang, H., Shi, L., Cai, Y., Shen, C., Ling, J., Xie, X., Cai, Y., … Deng, Y. (2022). Neoadjuvant PD-1 blockade with toripalimab, with or without celecoxib, in mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high, locally advanced, colorectal cancer (PICC): a single-centre, parallel-group, non-comparative, randomised, phase 2 trial. The lancet. Gastroenterology & hepatology, 7(1), 38–48. https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00348-4
243. Grothey, A., Sobrero, A., Shields, A. F., Yoshino, T., Paul, J., Taieb, J., Souglakos, J., Shi, Q., Kerr, R. B., Labianca, R., Meyerhardt, J. A., Vernerey, D., Yamanaka, T., Boukovinas, I., Meyers, J., Renfro, L. A., Niedzwiecki, D., Watanabe, T., Torri, V., . . . Iveson, T. (2018). Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. The New England Journal of Medicine, 378(13), 1177-1188. https://doi.org/10.1056/nejmoa1713709
244. Sinicrope, F. A., Ou, F., Zemla, T., Nixon, A. B., Mody, K., Levasseur, A., Dueck, A. C., Dhanarajan, A., Lieu, C. H., Cohen, D. J., Innocenti, F., Behrens, R. G., Peters, W., Sommer, N., O'Reilly, E. M., & Meyerhardt, J. A. (2019). Randomized trial of standard chemotherapy alone or combined with atezolizumab as adjuvant therapy for patients with stage III colon cancer and deficient mismatch repair (ATOMIC, Alliance A021502). Journal of Clinical Oncology, 37(15_suppl), e15169. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e15169
245. Xie, Y., Chen, Y., & Fang, J. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. Signal Transduction and Targeted Therapy, 5(1). https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

246. Cervantes, A., Adam, R., Roselló, S., Arnold, D., Normanno, N., Taïeb, J., Seligmann, J., De Baere, T., Osterlund, P., Yoshino, T., & Siena, S. (2022). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, 34(1), 10-32. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003
247. Marques RP, Godinho AR, Heudtlass P, Pais HL, Quintela A, Martins AP. Cetuximab versus bevacizumab in metastatic colorectal cancer: a comparative effectiveness study. J Cancer Res Clin Oncol. 2020 May;146(5):1321-1334. doi: 10.1007/s00432-020-03167-0. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32144533.
248. Zi-Nan Li, Lin Zhao, Li-Feng Yu, Min-Jie Wei, BRAF and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: future perspectives for personalized therapy, Gastroenterology Report, Volume 8, Issue 3, June 2020, Pages 192–205, https://doi.org/10.1093/gastro/goaa022
249. Venderbosch, S., Nagtegaal, I. D., Maughan, T. S., Smith, C. G., Cheadle, J. P., Fisher, D., Kaplan, R., Quirke, P., Seymour, M. T., Richman, S. D., Meijer, G. A., Ylstra, B., Heideman, D. A., de Haan, A. F., Punt, C. J., & Koopman, M. (2014). Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. Clinical cancer research : an official journal of theAmerican Association for Cancer Research, 20(20), 5322–5330. https://doi.org/10.1158/1078- 0432.CCR-14-0332
250. Hecht, J. R., Mitchell, E., Chidiac, T., Scroggin, C., Hagenstad, C., Spigel, D., Marshall, J., Cohn, A., McCollum, D., Stella, P., Deeter, R., Shahin, S., & Amado, R. G. (2009). A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 27(5), 672–680. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8135
251. ResearchU.S. Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-first-line-treatment-msi-hdmmr-colorectal-cancer
252. Shiu, K., André, T., Kim, T. Y., Jensen, B. V., Jensen, L. J., Punt, C. J. A., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., De La Fouchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Bendell, J. C., Le, D. T., Yoshino, T., Yang, P., Farooqui, M., Marinello, P., & Diaz, L. A. (2021). KEYNOTE-177: Phase III randomized study of pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high advanced colorectal cancer. Journal of Clinical Oncology, 39(3_suppl), 6. https://doi.org/10.1200/jco.2021.39.3_suppl.6
253. André, T., Cohen, R., & Salem, M. L. (2022). Immune Checkpoint Blockade Therapy in Patients With Colorectal Cancer Harboring Microsatellite Instability/Mismatch Repair Deficiency in2022. American Society of Clinical Oncology educational book, 42, 233-241. https://doi.org/10.1200/edbk_349557
254. André, T., Van Cutsem, E., Elez, E., Bennouna, J., De La Fouchardiere, C., Yoshino, T., Jensen, L. S., Mendez, G., Li, J. C., Goekkurt, E., Abdullaev, S. S., Chen, T., Lei, M., & Lonardi, S. (2022). P-12 A phase 3 study of nivolumab (NIVO), NIVO + ipilimumab (IPI), or chemotherapy for microsatellite instability-high (MSI-H)/mismatch repair-deficient (dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC): CheckMate 8HW. Annals of Oncology, 33, S250. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.04.104
255. Mulet-Margalef, N., Linares, J., Badia-Ramentol, J., Jimeno, M., Sanz Monte, C., Manzano Mozo, J. L., & Calon, A. (2023). Challenges and Therapeutic Opportunities in the dMMR/MSI- H Colorectal Cancer Landscape. Cancers, 15(4), 1022. https://doi.org/10.3390/cancers15041022
256. Marmorino, F., Boccaccino, A., Germani, M. M., Falcone, A., & Cremolini, C. (2020). Immune Checkpoint Inhibitors in pMMR Metastatic Colorectal Cancer: A Tough Challenge. Cancers, 12(8), 2317. https://doi.org/10.3390/cancers12082317
257. Taniguchi, H., Yamanaka, T., Sakai, D., Yamazaki, K., Muro, K., Peeters, M., & Price, T. J. (2018). Panitumumab versus cetuximab in patients with wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer who received prior bevacizumab therapy: A combined analysis of individual

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

patient data from ASPECCT and WJOG6510G. Journal of Clinical Oncology. https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.4_suppl.745

258. Tabernero, J., Yoshino, T., Cohn, A. L., Obermannova, R., Bodoky, G., Garcia-Carbonero, R., Ciuleanu, T., Portnoy, D. S., Van Cutsem, E., Grothey, A., Prausová, J., García-Alfonso, P., Yamazaki, K., Clingan, P., Lonardi, S., Kim, T. Y., Simms, L., Chang, S., & Nasroulah, F. (2015). Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. Lancet Oncology, 16(5), 499-508. https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)70127-0
259. Aparicio, J., Esposito, F., Serrano, S., Falco, E., Escudero, P., Ruiz-Casado, A., Manzano, H., & Fernandez-Montes, A. (2020). Metastatic Colorectal Cancer. First Line Therapy for Unresectable Disease. Journal of clinical medicine, 9(12), 3889. https://doi.org/10.3390/jcm9123889
260. Kopetz, S., Bekaii-Saab, T., Yoshino, T., Chung, C., Zhang, X., & Tabernero, J. (2022). SEAMARK: Randomized phase 2 study of pembrolizumab + encorafenib + cetuximab versus pembrolizumab alone for first-line treatment of BRAF V600E-mutant and microsatellite instability-high (MSI-H)/mismatch repair deficient (dMMR) metastatic colorectal cancer (CRC). Journal of Clinical Oncology, 40(16_suppl), TPS3634. https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.tps3634
261. Montes, A., Grávalos, C., Pericay, C., Safont, M. J., Benavides, M., Elez, E., García-Alfonso, P., García-Paredes, B., Carrato, A., & Aranda, E. (2020). Current Options for Third-line and Beyond Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. Spanish TTD Group Expert Opinion. Clinical Colorectal Cancer, 19(3), 165-177. https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.04.003
262. Djaballah, S. A., Daniel, F., Milani, A. M., Ricagno, G., & Lonardi, S. (2022). HER2 in Colorectal Cancer: The Long and Winding Road From Negative Predictive Factor to Positive Actionable Target. American Society of Clinical Oncology educational book, 42, 219-232. https://doi.org/10.1200/edbk_351354
263. Vera, R., Aparicio, J., Carballo, F., Esteva, M., González-Flores, E., Santianes, J., Santolaya, F., & Fernández-Cebrián, J. M. (2019). Recommendations for follow-up of colorectal cancer survivors. Clinical & Translational Oncology, 21(10), 1302-1311. https://doi.org/10.1007/s12094-019-02059-1
264. Locker, G. Y., Hamilton, S., Harris, J., Jessup, J. M., Kemeny, N., Macdonald, J. S., Somerfield, M. R., Hayes, D. F., Bast, R. C., Jr, & ASCO (2006). ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 24(33), 5313–5327. https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.2644
265. Duffy M. J. (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?. Clinical chemistry, 47(4), 624–630.
266. Konishi, T., Shimada, Y., Hsu, M., Tufts, L., Jimenez-Rodriguez, R., Cercek, A., Yaeger, R., Saltz, L., Smith, J. J., Nash, G. M., Guillem, J. G., Paty, P. B., Garcia-Aguilar, J., Gonen, M., & Weiser, M. R. (2018). Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. JAMA oncology, 4(3), 309–315. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4420
267. Arisi, M. F., Dotan, E., & Fernandez, S. V. (2022). Circulating Tumor DNA in Precision Oncology and Its Applications in Colorectal Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 23(8), 4441. https://doi.org/10.3390/ijms23084441
268. Molnár, B., Galamb, O., Kalmár, A., Barták, B. K., Nagy, Z. B., Tóth, K., Tulassay, Z., Igaz, P., & Dank, M. (2019). Circulating cell-free nucleic acids as biomarkers in colorectal cancer screening and diagnosis - an update. Expert Review of Molecular Diagnostics, 19(6), 477-498. https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1613891

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

269. Nassar, F. J., Msheik, Z. S., Nasr, R., & Temraz, S. (2021). Methylated circulating tumor DNA as a biomarker for colorectal cancer diagnosis, prognosis, and prediction. Clinical Epigenetics, 13(1). https://doi.org/10.1186/s13148-021-01095-5
270. Chen, B., Xia, Z., Deng, Y. N., Yang, Y., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N., & Liang, S. (2019). Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. Open biology, 9(1), 180212. https://doi.org/10.1098/rsob.180212
271. Alves Dos Santos, K., Clemente Dos Santos, I. C., Santos Silva, C., Gomes Ribeiro, H., de Farias Domingos, I., & Nogueira Silbiger, V. (2020). Circulating Exosomal miRNAs as Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer. International journal of molecular sciences, 22(1), 346. https://doi.org/10.3390/ijms22010346
272. Sun, L., Liu, X., Pan, B., Hu, X., Zhu, Y., Su, Y., Guo, Z., Zhang, G., Xu, M., Xu, X., Sun, H., & Wang, S. (2020). Serum exosomal miR-122 as a potential diagnostic and prognostic biomarker of colorectal cancer with liver metastasis. Journal of Cancer, 11(3), 630–637. https://doi.org/10.7150/jca.33022
273. Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., & Christou, N. (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. Cancer science, 111(9), 3142–3154. https://doi.org/10.1111/cas.14532
274. Peters, G. (2020). Drug resistance in colorectal cancer: General aspects. En Elsevier eBooks (pp. 1-33). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819937-4.00001-7
275. Bitar, S. A., El-Sabban, M., Doughan, S., & Abou-Kheir, W. (2023). Molecular mechanisms targeting drug-resistance and metastasis in colorectal cancer: Updates and beyond. World Journal of Gastroenterology, 29(9), 1395-1426. https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i9.1395
276. Agencia Española del Medicamento. (2016). Informe de Posicionamiento Terapéutico de trifluridina/tipiracil hidrocloruro (Lonsurf®) en cáncer colorrectal. En https://www.aemps.gob.es (IPT, 58/2016. V1).
277. Zhao, B., Wang, L., Qiu, H., Zhang, M., Sun, L., Peng, P., Yu, Q., & Yuan, X. (2017).Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. Oncotarget, 8(3), 3980– 4000. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14012
278. Wang, Q., Shen, X., Chen, G., & Du, J. (2022). Drug Resistance in Colorectal Cancer: From Mechanism to Clinic. Cancers, 14(12), 2928. https://doi.org/10.3390/cancers14122928
279. Shan, J., Han, D., Shen, C., Lei, Q., & Zhang, Y. (2022). Mechanism and strategies of immunotherapy resistance in colorectal cancer. Frontiers in immunology, 13, 1016646. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1016646
280. Tadesse, S., Yu, M., Kumarasiri, M., Le, B. T., & Wang, S. (2015). Targeting CDK6 in cancer: State of the art and new insights. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 14(20), 3220–3230. https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1084445
281. Thoma, O., Neurath, M. F., & Waldner, M. J. (2021). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors and Their Therapeutic Potential in Colorectal Cancer Treatment. Frontiers in Pharmacology, 12. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.757120
282. Mohammad Rezaei, F., Hashemzadeh, S., Ravanbakhsh Gavgani, R., Hosseinpour Feizi, M., Pouladi, N., Samadi Kafil, H., Rostamizadeh, L., Kholghi Oskooei, V., Taheri, M., & Sakhinia, E. (2019). Dysregulated KDR and FLT1 Gene Expression in Colorectal Cancer Patients. Reports of biochemistry & molecular biology, 8(3), 244–252.
283. Wei, S., Tsao, P., Weng, M., Cao, Z., & Wong, J. (2013b). Flt-1 in colorectal cancer cells is required for the tumor invasive effect of placental growth factor through a p38-MMP9 pathway. Journal of Biomedical Science, 20(1). https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-39
284. Saunders, A. S., Bender, D. E., Ray, A. L., Wu, X., & Morris, K. T. (2021). Colony-stimulating factor 3 signaling in colon and rectal cancers: Immune response and CMS classification in TCGA data. PloS one, 16(2), e0247233. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247233
285. Lim, S. H., Kim, S. Y., Kim, K., Jang, H., Ahn, S., Kim, K. M., Kim, N. K., Park, W., Lee, S. J., Kim, S. T., Park, S. H., Park, J. O., Park, Y. S., Lee, S. H., Lim, H. Y., Park, K., Kang, W. K., & Lee, J. (2017). The implication of FLT3 amplification for FLT targeted therapeutics in solid tumors. Oncotarget, 8(2), 3237–3245. https://doi.org/10.18632/oncotarget.13700

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

286. Hasegawa, H., Taniguchi, H., Nakamura, Y., Kato, T., Fujii, S., Ebi, H., Shiozawa, M., Yuki, S., Masuishi, T., Kato, K., Izawa, N., Moriwaki, T., Oki, E., Kagawa, Y., Denda, T., Nishina, T., Tsuji, A., Hara, H., Esaki, T., Nishida, T., … Yoshino, T. (2021). FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) amplification in patients with metastatic colorectal cancer. Cancer science, 112(1), 314–322. https://doi.org/10.1111/cas.14693
287. Wang, C., Aikemu, B., Shao, Y., Zhang, S., Yang, G., Hong, H., Huang, L., Jia, H., Yang, X., Zheng, M., Sun, J., & Li, J. (2022). Genomic signature of MTOR could be an immunogenicity marker in human colorectal cancer. BMC Cancer, 22(1). https://doi.org/10.1186/s12885-022-09901-w
288. Tay, R. E., Richardson, E., & Toh, H. C. (2020). Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. Cancer Gene Therapy, 28(1-2), 5-17. https://doi.org/10.1038/s41417-020-0183-x
289. Deau, M. C., Heurtier, L., Frange, P., Suarez, F., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., Cavazzana, M., Picard, C., Durandy, A., Fischer, A., & Kracker, S. (2014). A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. The Journal of clinical investigation, 124(9), 3923–3928. https://doi.org/10.1172/JCI75746
290. Lucas, C. L., Zhang, Y., Venida, A., Wang, Y., Hughes, J., McElwee, J., Butrick, M., Matthews, H., Price, S., Biancalana, M., Wang, X., Richards, M., Pozos, T., Barlan, I., Ozen, A., Rao, V. K., Su, H. C., & Lenardo, M. J. (2014). Heterozygous splice mutation in PIK3R1 causes human immunodeficiency with lymphoproliferation due to dominant activation of PI3K. The Journal of experimental medicine, 211(13), 2537–2547. https://doi.org/10.1084/jem.20141759
291. Luo, Z., Zhu, M., Zhang, Z., Ye, F., Huang, W. C., & Luo, X. (2019). Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis. BMC Cancer, 19(1). https://doi.org/10.1186/s12885-019-5324-y
292. Lai, X., Dong, Q., Xu, F., Wu, S., Yang, D., Liu, C., Li, Y., Li, Z., & Ma, D. (2021). Correlation of c-MET expression with clinical characteristics and the prognosis of colorectal cancer. Journal of gastrointestinal oncology, 12(5), 2203–2210. https://doi.org/10.21037/jgo-21-536
293. Coss, A., Tosetto, M., Fox, E. J., Sapetto-Rebow, B., Gorman, S., Kennedy, B. N., Lloyd, A. T., Hyland, J. M., O'Donoghue, D. P., Sheahan, K., Leahy, D. T., Mulcahy, H. E., & O'Sullivan, J. N. (2009). Increased topoisomerase IIalpha expression in colorectal cancer is associated with advanced disease and chemotherapeutic resistance via inhibition of apoptosis. Cancer letters, 276(2), 228–238. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.11.018
294. Wang, D., Li, Y., Liu, Y., Cheng, S., Liu, F., Zuo, R., Ding, C., Shi, S., & Liu, G. (2022). NPM1 promotes cell proliferation by targeting PRDX6 in colorectal cancer. The international journal of biochemistry & cell biology, 147, 106233. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106233
295. National Cancer Institute (US). (2023, 4 abril). Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®). PDQ Cancer Information Summaries - NCBI Bookshelf. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK126744/
296. Gilbert, D. C., Chalmers, A. J., & El-Khamisy, S. F. (2012). Topoisomerase I inhibition in colorectal cancer: biomarkers and therapeutic targets. British journal of cancer, 106(1), 18–24. https://doi.org/10.1038/bjc.2011.498
297. Kamata, T., Hussain, J., Giblett, S., Hayward, R., Marais, R., & Pritchard, C. (2010). BRAF inactivation drives aneuploidy by deregulating CRAF. Cancer research, 70(21), 8475–8486. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0603
298. Noeparast, A., Teugels, E., Giron, P., Verschelden, G., De Brakeleer, S., Decoster, L., & De Grève, J. (2016). Non-V600 BRAF mutations recurrently found in lung cancer predict sensitivityto the combination of Trametinib and Dabrafenib. Oncotarget, 8(36), 60094–60108. https://doi.org/10.18632/oncotarget.11635
299. Hou, J. Y., Baptiste, C., Hombalegowda, R. B., Tergas, A. I., Feldman, R., Jones, N. L., Chatterjee-Paer, S., Bus-Kwolfski, A., Wright, J. D., & Burke, W. M. (2017). Vulvar andvaginal melanoma: A unique subclass of mucosal melanoma based on a comprehensive molecular analysis of 51 cases compared with 2253 cases of nongynecologic melanoma. Cancer,123(8), 1333–1344. https://doi.org/10.1002/cncr.30473

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

300. Fuchs, J., Cheblal, A., & Gasser, S. M. (2021). Underappreciated Roles of DNA Polymerase δ in Replication Stress Survival. Trends in Genetics, 37(5), 476-487. https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.12.003
301. Xu, W., Lai, Y., Pan, Y., Tan, M., Ma, Y., Sheng, H., & Wang, J. (2022). m6A RNA methylation-mediated NDUFA4 promotes cell proliferation and metabolism in gastric cancer. Cell death & disease, 13(8), 715. https://doi.org/10.1038/s41419-022-05132-w
302. Manzat Saplacan, R. M., Balacescu, L., Gherman, C., Chira, R. I., Craiu, A., Mircea, P. A., Lisencu, C., & Balacescu, O. (2017). The Role of PDGFs and PDGFRs in Colorectal Cancer. Mediators of inflammation, 2017, 4708076. https://doi.org/10.1155/2017/4708076
303. NDUFV3 NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit V3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. (s. f.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4731
304. OncoKBTM - MSK's Precision Oncology Knowledge Base. (s. f.). OncoKBTM. https://www.oncokb.org/gene/RET/D1031N
305. Sloan, R., Huang, S. N., Pommier, Y., & Jinks-Robertson, S. (2017). Effects of camptothecin or TOP1 overexpression on genetic stability in Saccharomyces cerevisiae. DNA repair, 59, 69–75. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.09.004
306. Palshof, J. A., Høgdall, E. V., Poulsen, T. S., Linnemann, D., Jensen, B. V., Pfeiffer, P., Tarpgaard, L. S., Brünner, N., Stenvang, J., Yilmaz, M., & Nielsen, D. L. (2017). TopoisomeraseI copy number alterations as biomarker for irinotecan efficacy in metastatic colorectal cancer. BMC cancer, 17(1), 48. https://doi.org/10.1186/s12885-016-3001-y
307. RRM1 ribonucleotide reductase catalytic subunit M1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. (s. f.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6240
308. TUBB3 tubulin beta 3 class III [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. (s. f.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10381
309. Tóth, C., Sükösd, F., Valicsek, E., Herpel, E., Schirmacher, P., Renner, M., Mader, C., Tiszlavicz, L., & Kriegsmann, J. (2017). Expression of ERCC1, RRM1, TUBB3 in correlation with apoptosis repressor ARC, DNA mismatch repair proteins and p53 in liver metastasis of colorectal cancer. International journal of molecular medicine, 40(5), 1457–1465. https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3136
310. Qi, H., Lou, M., Chen, Y., Liu, X., Chen, N., Shan, J., Ling, Z., Shen, J., Zhu, L., Yen, Y., Zheng, S., & Shao, J. (2015). Non-enzymatic action of RRM1 protein upregulates PTEN leading to inhibition of colorectal cancer metastasis. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 36(6), 4833–4842. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3137-4
311. Zhou, Z. W., Ambrogio, C., Bera, A. K., Li, Q., Li, X. X., Li, L., Son, J., Gondi, S., Li, J., Campbell, E., Jin, H., Okoro, J. J., Xu, C. X., Janne, P. A., & Westover, K. D. (2020). KRASQ61H Preferentially Signals through MAPK in a RAF Dimer-Dependent Manner in Non- Small Cell Lung Cancer. Cancer research, 80(17), 3719–3731. https://doi.org/10.1158/0008- 5472.CAN-20-0448
312. Peng, S., & Fu, Y. (2023). FYN: emerging biological roles and potential therapeutic targets in cancer. Journal of Translational Medicine, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12967-023-03930-0
313. Borowski, C., & Bendelac, A. (2005). Signaling for NKT cell development: the SAP-FynT connection. The Journal of experimental medicine, 201(6), 833–836. https://doi.org/10.1084/jem.20050339
314. Ferreira, M., & Reckamp, K. L. (2022). Editorial: Impact of immunotherapy in lung cancer. Frontiers in oncology, 12, 1083524. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1083524
315. Wang, X., Shi, J., Huang, M., Chen, J., Dan, J., Tang, Y., Guo, Z., He, X., & Zhao, Q. (2023). TUBB2B facilitates progression of hepatocellular carcinoma by regulating cholesterol metabolism through targeting HNF4A/CYP27A1. Cell death & disease, 14(3), 179. https://doi.org/10.1038/s41419-023-05687-2
316. Nami, B., & Wang, Z. (2018). Genetics and Expression Profile of the Tubulin Gene Superfamily in Breast Cancer Subtypes and Its Relation to Taxane Resistance. Cancers, 10(8), 274. https://doi.org/10.3390/cancers10080274

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

317. Meng, L., Yang, X., Xie, X., & Wang, M. (2019). Mitochondrial NDUFA4L2 protein promotes the vitality of lung cancer cells by repressing oxidative stress. Thoracic cancer, 10(4), 676–685. https://doi.org/10.1111/1759-7714.12984
318. Li, F., Ng, W. L., Luster, T. A., Hu, H., Sviderskiy, V. O., Dowling, C. M., Hollinshead, K. E. R., Zouitine, P., Zhang, H., Huang, Q., Ranieri, M., Wang, W., Fang, Z., Chen, T., Deng, J., Zhao, K., So, H. C., Khodadadi-Jamayran, A., Xu, M., Karatza, A., … Wong, K. K. (2020). Epigenetic CRISPR Screens Identify Npm1 as a Therapeutic Vulnerability in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer research, 80(17), 3556–3567. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3782
319. Zou, K., Gao, P., Xu, X., Zhang, W., & Zeng, Z. (2023). Upregulation of NDUFAF2 in Lung Adenocarcinoma Is a Novel Independent Prognostic Biomarker. Computational and mathematical methods in medicine, 2023, 2912968. https://doi.org/10.1155/2023/2912968
320. Mizuno, T., Yamasaki, N., Miyazaki, K., Tazaki, T., Koller, R., Oda, H., Honda, Z. I., Ochi, M., Wolff, L., & Honda, H. (2008). Overexpression/enhanced kinase activity of BCR/ABL and altered expression of Notch1 induced acute leukemia in p210BCR/ABL transgenic mice. Oncogene, 27(24), 3465–3474. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1211007
321. Oh, S., Jo, S., Bajzikova, M., Kim, H. S., Dao, T. T. P., Rohlena, J., Kim, J. M., Neuzil, J., & Park, S. (2023). Non-bioenergetic roles of mitochondrial GPD2 promote tumor progression. Theranostics, 13(2), 438–457. https://doi.org/10.7150/thno.75973
322. Liu, Y., Li, X., Chang, R., Chen, Y., & Gao, Y. (2020). PLEK2 and SCN7A: novel biomarkers of non-small cell lung cancer. Research Square (Research Square). https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-20024/v1
323. Du, X., Shao, Y., Qin, H. F., Tai, Y. H., & Gao, H. J. (2018). ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). Thoracic cancer, 9(4), 423–430. https://doi.org/10.1111/1759-7714.12613
324. Rogers, C., Morrissette, J. J., & Sussman, R. T. (2022). NTRK point mutations and theirfunctional consequences. Cancer genetics, 262-263, 5-15. https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2021.12.002
325. Xu, C., Wang, W., Wang, D., Zhu, Y. S., Zhuang, W., Fang, M., Lv, T., & Song, Y. (2021). P59.01 AR Mutations Defines a Unique Molecular Class of Non-Small Cell Lung Cancer in East Asian Patients. Journal of Thoracic Oncology, 16(3), S537. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.01.952
326. Durovski, D., Jankovic, M., & Prekovic, S. (2023). Insights into Androgen Receptor Action in Lung Cancer. Endocrines, 4(2), 269-280. https://doi.org/10.3390/endocrines4020022
327. Khaddour, K., Fernandez, M., Khabibov, M. M., Garifullin, A., Dressler, D., Topchu, I., Patel, J. D., Weinberg, F., & Boumber, Y. (2022). The Prognostic and Therapeutic Potential of DNA Damage Repair Pathway Alterations and Homologous Recombination Deficiency in Lung Cancer. Cancers, 14(21), 5305. https://doi.org/10.3390/cancers14215305
328. Vendetti, F. P., Lau, A. P. T., Schamus, S., Conrads, T. P., O'Connor, M. K., & Bakkenist, C. J. (2015). The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancerin vivo. Oncotarget, 6(42), 44289-44305. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6247
329. Dunne, V. L., Ghita, M., Small, D. M., Coffey, C. B. M., Weldon, S., Taggart, C. C., Osman, S. O., McGarry, C. K., Prise, K. M., Hanna, G. G., & Butterworth, K. T. (2017). Inhibition of ataxia telangiectasia related-3 (ATR) improves therapeutic index in preclinical models of non- small cell lung cancer (NSCLC) radiotherapy. Radiotherapy and Oncology, 124(3), 475-481. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.06.025
330. Huang, X., Hu, P., & Zhang, J. (2020). Genomic analysis of the prognostic value of colony-stimulating factors (CSFs) and colony-stimulating factor receptors (CSFRs) across 24 solid cancer types. Annals of translational medicine, 8(16), 994. https://doi.org/10.21037/atm-20-5363
331. Wang, Y., Chen, P., Zhao, M., Cao, H., Zhao, Y., Ji, M., Hou, P., & Chen, M. (2022). EGFL7 drives the evolution of resistance to EGFR inhibitors in lung cancer by activating NOTCH signaling. Cell Death & Disease, 13(10). https://doi.org/10.1038/s41419-022-05354-y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

332. Berger, W., Setinek, U., Mohr, T., Kindas-Mügge, I., Vetterlein, M., Dekan, G., Eckersberger, F., Caldas, C., & Micksche, M. (1999). Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells. International journal of cancer, 83(3), 415–423. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19991029)83:3<415::aid-ijc19>3.0.co;2-y
333. Chen, F., Takenaka, K., Ogawa, E., Yanagihara, K., Otake, Y., Wada, H., & Tanaka, F. (2004). Flt-4-positive endothelial cell density and its clinical significance in non-small cell lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 10(24), 8548–8553. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0950
334. Ma, X., Dong, L., Liu, X., Ou, K., & Yang, L. (2022). POLE/POLD1 mutation and tumor immunotherapy. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 41(1), 216. https://doi.org/10.1186/s13046-022-02422-1
335. Van Egeren, D., Kohli, K., Warner, J. L., Bedard, P. L., Riely, G. J., Lepisto, E. M., Schrag, D., LeNoue-Newton, M., Catalano, P. J., Kehl, K. L., Michor, F., Fiandalo, M., Foti, M., Khotskaya, Y., Lee, J. Y. V., Peters, N., Sweeney, S., Abraham, J. M., Brenton, J. D., . . . Rabadan, R. (2022). Genomic analysis of early-stage lung cancer reveals a role for TP53 mutations in distant metastasis. Scientific Reports, 12(1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-21448-1
336. Wagner, P. L., Stiedl, A. C., Wilbertz, T., Petersen, K., Scheble, V., Menon, R., Reischl, M., Mikut, R., Rubin, M. A., Fend, F., Moch, H., Soltermann, A., Weder, W., Altorki, N. K., & Perner, S. (2011). Frequency and clinicopathologic correlates of KRAS amplification in non- small cell lung carcinoma. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands), 74(1), 118–123. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.01.029
337. Liang, H., & Wang, M. (2020). MET Oncogene in Non-Small Cell Lung Cancer: Mechanism of MET Dysregulation and Agents Targeting the HGF/c-Met Axis. OncoTargets and therapy, 13, 2491–2510. https://doi.org/10.2147/OTT.S231257
338. Tumini, E., Barroso, S., -Calero, C. P., & Aguilera, A. (2016). Roles of human POLD1 and POLD3 in genome stability. Scientific reports, 6, 38873. https://doi.org/10.1038/srep38873
339. Jakobsen, A. K., Yuusufi, S., Madsen, L. B., Meldgaard, P., Knudsen, B. R., & Stougaard, M. (2022). TDP1 and TOP1 as targets in anticancer treatment of NSCLC: Activity and protein level in normal and tumor tissue from 150 NSCLC patients correlated to clinical data. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands), 164, 23–32. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.12.010
340. Wu, A., Wu, B., Guo, J., Luo, W., Wu, D., Yang, H., Zhen, Y., Yu, X., Wang, H., Zhou, Y., Liu, Z., Fang, W., & Yang, Z. (2011). Elevated expression of CDK4 in lung cancer. Journal of translational medicine, 9, 38. https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-38
341. Powell, S., Kaizer, A., Koopmeiners, J. S., Iwamoto, C., & Klein, M. (2014). High expression of class III β-tubulin in small cell lung carcinoma. Oncology letters, 7(2), 405–410. https://doi.org/10.3892/ol.2013.1734
342. Kou, F., Sun, H., Wu, L., Li, B., Zhang, B., Wang, X., & Yang, L. (2020). TOP2A Promotes Lung Adenocarcinoma Cells' Malignant Progression and Predicts Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma. Journal of Cancer, 11(9), 2496–2508. https://doi.org/10.7150/jca.41415
343. Tan A. C. (2020). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). Thoracic cancer, 11(3), 511–518. https://doi.org/10.1111/1759-7714.13328
344. Zafra, M. P., Parsons, M. J., Kim, J., Alonso-Curbelo, D., Goswami, S., Schatoff, E. M., Han, T., Katti, A., Fernandez, M. T. C., Wilkinson, J. E., Piskounova, E., & Dow, L. E. (2020). An In Vivo Kras Allelic Series Reveals Distinct Phenotypes of Common Oncogenic Variants. Cancer discovery, 10(11), 1654–1671. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0442
345. Garcia, B. N. C., Van Kempen, L. C., Kuijpers, C. C. H. J., Schuuring, E., Willems, S. M., & Van Der Wekken, A. J. (2022). Prevalence of KRAS p.(G12C) in stage IV NSCLC patients in the Netherlands; a nation-wide retrospective cohort study. Lung Cancer, 167, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.03.015
346. Zhang, J., Yin, Y., Niu, X. M., Liu, Y., Garfield, D., Chen, S. F., Wang, R., Wang, L., & Chen, H. Q. (2013). CYP19A1 gene polymorphisms and risk of lung cancer. The Journal of international medical research, 41(3), 735–742. https://doi.org/10.1177/0300060513477291

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

347. Zhang, C., Cheng, Y., Chen, W., Li, Q., Dai, R., Wang, Y., & Yang, T. (2022). Association of CYP19A1 rs28757157 polymorphism with lung cancer risk in the Chinese Han population. World journal of surgical oncology, 20(1), 400. https://doi.org/10.1186/s12957-022-02868-9
348. Raghav, K. P. S., Gonzalez-Angulo, A. M., & Blumenschein, G. R. (2012). Role of HGF/MET axis in resistance of lung cancer to contemporary management. PubMed, 1(3), 179-193. https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2012.09.04
349. Soltis, A. R., Bateman, N. W., Liu, J., Nguyen, C. V., Franks, T. J., Zhang, X., Dalgard, C. L., Viollet, C., Somiari, S., Yan, C., Zeman, K., Skinner, W. J., Lee, J. S., Pollard, H. B., Turner, C., Petricoin, E. F., Meerzaman, D., Conrads, T. P., Hu, H. M., . . . Wilkerson, M. D. (2022). Proteogenomic analysis of lung adenocarcinoma reveals tumor heterogeneity, survival determinants, and therapeutically relevant pathways. Cell reports medicine, 3(11), 100819. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100819
350. Cerrato, A., Morra, F., Di Domenico, I., & Celetti, A. (2019). NSCLC Mutated Isoforms of CCDC6 Affect the Intracellular Distribution of the Wild Type Protein Promoting Cisplatinum Resistance and PARP Inhibitors Sensitivity in Lung Cancer Cells. Cancers, 12(1), 44. https://doi.org/10.3390/cancers12010044
351. Baty, F., Joerger, M., Früh, M., Klingbiel, D., Zappa, F., & Brutsche, M. (2017). 24h-gene variation effect of combined bevacizumab/erlotinib in advanced non-squamous non-small cell lung cancer using exon array blood profiling. Journal of translational medicine, 15(1), 66. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1174-z
352. Wei, X. W., Gao, X., Zhang, X. C., Yang, J. J., Chen, Z. H., Wu, Y. L., & Zhou, Q. (2020). Mutational landscape and characteristics of ERBB2 in non-small cell lung cancer. Thoracic cancer, 11(6), 1512–1521. https://doi.org/10.1111/1759-7714.13419
353. Zhu, C. M., Lian, X. Y., Bi, Y. H., Hu, C. C., Liang, Y. W., & Li, Q. S. (2018). Prognostic value of ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1) in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 485, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.05.042
354. Chen, Y., Huang, Y., Chen, D. M., Wu, C., Leng, Q. P., Wang, W. Y., Deng, M. Q., Zhao, Y. X., & Yang, X. H. (2018). RRM1 expression and the clinicopathological characteristics of patients with non-small cell lung cancer treated with gemcitabine. OncoTargets and therapy, 11, 5579–5589. https://doi.org/10.2147/OTT.S162667
355. Ricciuti, B., Alessi, J. V. M., Elkrief, A., Wang, X. F., Cortellini, A., Li, Y., Vaz, V., Gupta, H. V., Pecci, F., Barrichello, A., Lamberti, G., Nguyen, T. D., Lindsay, J. O., Sharma, B., Felt, K., Rodig, S. J., Nishino, M. N., Sholl, L. M., Barbie, D. A., . . . Luo, J. (2022). Dissecting the clinicopathologic, genomic, and immunophenotypic correlates of KRASG12D-mutated non-small-cell lung cancer. Annals of Oncology, 33(10), 1029-1040. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.07.005
356. Xie, M., Xu, X., & Fan, Y. (2021). KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: An Emerging Promisingly Treatable Subgroup. Frontiers in oncology, 11, 672612. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.672612
357. Liu, C., Zheng, S., Wang, Z., Wang, S., Wang, X., Yang, L., Xu, H., Cao, Z., Feng, X., Xue, Q., Wang, Y., Sun, N., & He, J. (2022). KRAS-G12D mutation drives immune suppression and the primary resistance of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in non-small cell lung cancer. Cancer communications (London, England), 42(9), 828–847. https://doi.org/10.1002/cac2.12327
358. Evaluation of RMC-6236 in Subjects With Advanced Solid Tumors Harboring Specific Mutations in KRAS - Full Text View - ClinicalTrials.gov. (s. f.). https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05379985
359. Bullock, A. N., & Fersht, A. R. (2001). Rescuing the function of mutant p53. Nature reviews. Cancer, 1(1), 68–76. https://doi.org/10.1038/35094077
360. Santana-Codina, N., Chandhoke, A. S., Yu, Q., Małachowska, B., Kuljanin, M., Gikandi, A., Stańczak, M., Gableske, S., Jedrychowski, M. P., Scott, D., Aguirre, A. J., Fendler, W., Gray, N. S., & Mancias, J. D. (2020). Defining and Targeting Adaptations to Oncogenic KRASG12C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Inhibition Using Quantitative Temporal Proteomics. Cell Reports, 30(13), 4584-4599.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.021

361. Lin, C., Yeh, Y., Pan, S., Lu, S., Chen, Y. J., Chueh, W., & Wei, Y. (2020). Role of mitochondrial DNA copy number alteration in non-small cell lung cancer. Formosan Journal of Surgery, 53(5), 165-176. https://doi.org/10.4103/fjs.fjs_15_20
362. Wang, L., Hu, H., Pan, Y., Wang, R., Li, Y., Shen, L., Qin, G., Li, H., Cai, D., Sun, Y., & Chen, H. (2014). PIK3CA Mutations Frequently Coexist with EGFR/KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer and Suggest Poor Prognosis in EGFR/KRAS Wildtype Subgroup. PLOS ONE, 9(2), e88291. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088291
363. Zhao, J., Han, Y., Li, J., Chai, R., & Bai, C. (2019). Prognostic value of KRAS/TP53/PIK3CA in non-small cell lung cancer. Oncology letters, 17(3), 3233–3240. https://doi.org/10.3892/ol.2019.10012
364. Zhang, J., Xu, D., Zhou, Y., Zhu, Z., & Yang, X. (2021). Mechanisms and Implications of CDK4/6 Inhibitors for the Treatment of NSCLC. Frontiers in oncology, 11, 676041. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.676041

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexos

ANEXO 1: Plantilla de recogida de datos

1.1 Plantilla recogida de datos clínicos basales y de seguimiento

Datos basales: **Registro del caso**	**Nº de caso:** _____ **Fecha de inicio:**____/_____/_____ **Obtención del consentimiento informado:** ☐ Si ☐ No **Año de nacimiento:** _____ **Sexo:** ☐ M ☐ F **Población:** ☐ Nativo americano ☐ Blanco ☐ Asiático ☐ Bi-/Multiracial ☐ Nego/Afroamericano ☐ Desconocido ☐ Nativo Hawaiano/ Pacífico **Casos previos:** _____ **Comentarios:**

Datos basales: **Historia médica del paciente**	**Condición general** **Estado functional del paciente** (WHO/ECOG): ☐ Grado 0 ☐ Grado 1 ☐ Grado 2 ☐ Grado 3 ☐ Grado 4 **Medidas antropométricas** **Altura (cm): _____** **Peso (kg): _____** **Peso estable :** ☐ Si ☐ No ☐ Desconocido **Pérdida de peso (kg):_____en_____mes (es)** **Ganancia de peso (kg):_____en_____mes (es)** **Comentarios:** **Hábitos:** **Nutrición** **Vegetariano:** ☐ Si ☐ No ☐ Desconocido **Vegetariano desde (Año): _____** **Ingesta de carne (días por semana): _____** **Ingesta de fruta y vegetales:** ☐ Si ☐ No ☐ Desconocido **Ingesta de fruta y vegetales (días por semana): _____** **Comentarios:**

Actividad física

Físicamente activo: ☐ Si ☐ No ☐ Desconocido

Tipo de actividad	1-2/por semana	3-5/ por semana	6-7/ por semana	Desconocido
Gimnasio	☐	☐	☐	☐
Correr	☐	☐	☐	☐
Andar	☐	☐	☐	☐

Comentarios:

Uso de sustancias

☐ Ninguna ☐ Desconocido

Tipo	Cantidad	Unidad	1-2/sem	1-2/sem	3-5/sem	6-7/sem	Desconocido	Inicio	Fin
Cigarrillo			☐	☐	☐	☐	☐		
Puro			☐	☐	☐	☐	☐		
Tabaco masticable			☐	☐	☐	☐	☐		
Pipa			☐	☐	☐	☐	☐		
Picadura de tabaco			☐	☐	☐	☐	☐		
Cerveza			☐	☐	☐	☐	☐		
Licor			☐	☐	☐	☐	☐		
Vino			☐	☐	☐	☐	☐		
Cannabis			☐	☐	☐	☐	☐		
Cocaina			☐	☐	☐	☐	☐		
Heroina			☐	☐	☐	☐	☐		
Metanfetamina			☐	☐	☐	☐	☐		
LSD			☐	☐	☐	☐	☐		

Factores ambientales

Fumador pasivo: ☐ Si ☐ No ☐ Desconocido **Paquetes/año:** _____

Exposición a sustancias tóxicas: ☐ Si ☐ No ☐ Desconocido

☐ Arsenico	☐ Asbestos	☐ Cromo	☐ Diesel	☐ Limpieza en seco	☐ Polvo
☐ Minería	☐ Niquel	☐ Petroleo	☐ Radón	☐ Disolventes	☐ Talco

Comentarios:

Medicación actual

☐ Ninguna ☐ Desconocido

	Nombre del fármaco	Fecha de inicio	Fecha de fin
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			

Medicaciones adicionales:

Alergias medicamentosas

☐ Ninguna ☐ Desconocido

Tipo de alergia	< 1 m	>1 m	1-3 m	3-6 m	6-12 m	1-3 a	>3 a	desconocido
Analgésicos	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Antibioticos	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Contrastes	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Otros:	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Comentarios:

Enfermedades previas

☐ Ninguna ☐ Desconocido

Código ICD-10	Tipo de enfermedad	Fecha del diagnóstico	Activa hasta

Comentarios:

Cirugías previas

☐ Ninguna ☐ Desconocido

Órgano	Procedimiento	Fecha de la cirugía

Comentarios:

Historia oncológica (Personal)

☐ No ☐ Desconocido

Código ICD-10	Tipo de cancer	Fecha del diagnóstico	Remisión	T	N	M	G	Tratamiento

Comentarios:

Programas para la detección precoz del cáncer

☐ No ☐ Desconocido

Tipo	< 6 m	1/a	2/a	1-3 años	>3 a	Desconocido	Última revision
Colonoscopia	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
dermatólogo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Médico de cabecera	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Ginecólogo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Internista	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Mamografía	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Oncólogo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Neumólogo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Urólogo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

Comentarios:

Historia familiar oncológica: ☐ No ☐ Desconocida

Pariente	Código ICD-10	Tipo de cáncer	Vivo	Muerte relacionada con el cáncer
			☐ Sí ☐ No ☐ Desconocido	☐ Si ☐ No ☐ Desconocido
			☐ Sí ☐ No ☐ Desconocido	☐ Si ☐ No ☐ Desconocido
			☐ Sí ☐ No ☐ Desconocido	☐ Si ☐ No ☐ Desconocido
			☐ Sí ☐ No ☐ Desconocido	☐ Si ☐ No ☐ Desconocido
			☐ Sí ☐ No ☐ Desconocido	☐ Si ☐ No ☐ Desconocido
			☐ Sí ☐ No ☐ Desconocido	☐ Si ☐ No ☐ Desconocido
			☐ Sí ☐ No ☐ Desconocido	☐ Si ☐ No ☐ Desconocido
			☐ Sí ☐ No ☐ Desconocido	☐ Si ☐ No ☐ Desconocido

Comentarios:

Enfermedad actual

☐ No ☐ Desconocido

Código ICD-10	Diagnóstico	Fecha del diagnóstico	Presentación	Código ICD-10 del tumor primario (solo metástasis)
			☐ Primario ☐ Recaída ☐ Metastásico	
			☐ Primario ☐ Recaída ☐ Metastásico	
			☐ Primario ☐ Recaída ☐ Metastásico	
			☐ Primario ☐ Recaída ☐ Metastásico	
			☐ Primario ☐ Recaída ☐ Metastásico	

Comentarios:

Síntomas actual

Excreción

Movimientos intestinales:

☐ Melenas	☐ Cambios	☐ Estreñimiento	☐ Grasa en heces	☐ Aumento de la frecuencia
☐ Mucosidad en heces	☐ Color claro	☐ Semiblandas	☐ Dolor	☐ Intestino perezoso
☐ Heces de pequeño calibre	☐ Negras	☐ Diarrea acuosa	☐ Desconocido	☐ Normal

Micción:

☐ Anuria	☐ Orina oscura	☐ Hematuria	☐ Incontinencia	☐ Disuria
☐ Poliaquiuria	☐ Pérdidas de orina	☐ Estranguria	☐ Disfunción miccional	☐ Desconocido
☐ Normal				

Comentarios:

Signos y síntomas

☐ Desconocido

No	Signos	No	Síntomas
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Comentarios:

Datos basales:

Proceso diagnóstico

Diagnóstico pre-quirúrgico

Tipo	Hallazgos	Localización	Tamaño(cm)	T	N	M	G	Comentarios
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							
	☐ Yes ☐ No							

Tipo de sangre

Grupo	Factor Resus		
☐ O	☐ Positivo	☐ Negativo	☐ Desconocido
☐ A	☐ Positivo	☐ Negativo	☐ Desconocido
☐ B	☐ Positivo	☐ Negativo	☐ Desconocido
☐ AB	☐ Positivo	☐ Negativo	☐ Desconocido

Comentarios:

Marcadores tumorales

☐ N/A ☐ No

Tipo	Fecha	Valor	Unidad	Rangos de referencia	Desviación
☐ CEA					☐ S ☐ I ☐ Normal
☐ CA 19-9					☐ S ☐ I ☐ Normal
☐ CA 125					☐ S ☐ I ☐ Normal
☐ CA 15-3					☐ S ☐ I ☐ Normal
☐ PSA					☐ S ☐ I ☐ Normal
☐ AFP					☐ S ☐ I ☐ Normal
☐ NSE					☐ S ☐ I ☐ Normal

Comentarios:

Enfermedades infecciosas

☐ N/A ☐ No

Tipo	Infectious		
☐ Hepatitis A	☐ Si	☐ No	☐ Desconocido
☐ Hepatitis B	☐ Si	☐ No	☐ Desconocido
☐ Hepatitis C	☐ Si	☐ No	☐ Desconocido
☐ Hepatitis D	☐ Si	☐ No	☐ Desconocido
☐ Hepatitis E	☐ Si	☐ No	☐ Desconocido
☐ Tuberculosis	☐ Si	☐ No	☐ Desconocido

Comentarios:

Resultados hematológicos

☐ N/A ☐ No

Tipo	Fecha	Valor	Unidad	Rangos de referencia	Deviación
☐ Eritrocitos					☐ S ☐ I ☐ normal
☐ Hematocrito					☐ S ☐ I ☐ normal
☐ Hemoglobina					☐ S ☐ I ☐ normal
☐ Leucocitos					☐ S ☐ I ☐ normal
☐ MCH					☐ S ☐ I ☐ normal
☐ MCV					☐ S ☐ I ☐ normal
☐ Trombocitos					☐ S ☐ I ☐ normal

Comentarios:

Resultados coagulación

☐ N/A ☐ No

Tipo	Fecha	Valor	Unidad	Rangos de referencia	Deviación
☐ PT					☐ S ☐ I ☐ Normal
☐ INR					☐ S ☐ I ☐ Normal
☐ PTT					☐ S ☐ I ☐ Normal

Comentarios:

Datos seguimiento: **3-4 semanas post Qx**	**Información al alta** **Supervivencia al alta:** ☐ **Si** ☐**No** ☐**Desconocido** **Fecha de alta:**____/____/_____ **Indicencias** **durante el ingreso:** **Comentarios:** **Informa Anatomía Patológica** **Fecha del informe:** _____ **Órgano:** _____ **Localizaciónn del tumor:** _____ **Tamaño del tumor (cm):** _____ **Tipo Histológico:** _____ **Morfología (ICD-0-3): M-**_____/____ **T prefijo:** ☐ c ☐ p ☐ r ☐ y **TNM-T:** _____ **N prefijo:** ☐ c ☐ p ☐ r ☐ y **TNM-N:**____**Gánglios linfáticos positivos:**_____**/Total Examinados:** ___ **M prefijo:** ☐ c ☐ p ☐ r ☐ y **TNM-M:** _____ **L (Invasión linfática):** ☐ L0 ☐ L1 ☐ LX **V (Invasión vascular):** ☐ V0 ☐ V1 ☐ VX **R (radicalidad local):** ☐ R0 ☐ R1 ☐ R2 ☐ RX

R (radicalidad total): ☐ R0 ☐ R1 ☐ R2 ☐ RX

Grado: ☐ G1 ☐ G2 ☐ G3 ☐ G4 ☐ GX ☐ bajo grado ☐ alto grado

Estadio:_____

Edición TNM : ☐ 8th ☐ 7th

Clasificación: ☐ Maligno ☐ Benigno ☐ Normal

Mutaciones

☐ No ☐ Desconocido

Tipo	Estatus			
☐ MMR (MSS *vs* MSI)	☐ MSS	☐ MSI-L	☐MSI-H	☐ Desconocido
☐ BAP1	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ BRAF	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ BRCA 1	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ BRCA 2	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ c-KIT	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ CYP2D6	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ DPD	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ EGFR	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ EML4-ALK	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ IDH	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ KRAS	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ NRAS	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ PDGFRA	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido
☐ PIK3CA	☐ Nativo	☐ Mutado		☐ Desconocido

☐ ROS1	☐ Nativo	☐ Mutado	☐ Desconocido
☐ P53	☐ Nativo	☐ Mutado	☐ Desconocido
☐ PD-1	☐ Nativo	☐ Mutado	☐ Desconocido
☐ PD-L1	☐ Nativo	☐ Mutado	☐ Desconocido
☐ VEGF	☐ Nativo	☐ Mutado	☐ Desconocido

Comentarios:

Datos seguimiento:

6m, 1a y 2a

	Seguimiento 2	**Seguimiento 3**	**Seguimiento 4**
Periodo de seguimiento	☐ 6 meses	☐ 1 año	☐ 2 años
Fecha	___/___/_____	___/___/_____	___/___/_____
Obtención de sangre	☐ n/a ☐ Si ☐ No	☐ n/a ☐ Si ☐ No	☐ n/a ☐ Si ☐ No
Obtención de tejido	☐ n/a ☐ Si ☐ No	☐ n/a ☐ Si ☐ No	☐ n/a ☐ Si ☐ No
Estado del seguimiento	☐ activo ☐ perdido ☐rechazado	☐ activo ☐ perdido ☐rechazado	☐ activo ☐ perdido ☐rechazado
Mortalidad	☐ Vivo ☐ Fallecido	☐ Vivo ☐ Fallecido	☐ Vivo ☐ Fallecido
Progresión de la enfermedad	☐ Si ☐ No	☐ Si ☐ No	☐ Si ☐ No
Nuevo cancer	☐ Si ☐ No	☐ Si ☐ No	☐ Si ☐ No

Terapia Aduyuvante :

☐ Desconocida ☐ no administrada ☐ Si:

Tipo	Régimen/nombre del fármaco	Periodicidad	Total Ciclos/Grey	Fecha de inicio	Fecha de fin
☐ Quimioterapia					
☐ Radioterapia					
☐ Hormonoterapia					
☐ Inmunoterapia					
☐ Terapia dirigida					

Respuesta al tratamiento (RECIST)

☐ Desconocida

Código	Tipo de respuesta	Descripcicón	Fecha de la evaluación
☐ CR	Respuesta completa	Lesiones no detectadas en ≥ 4 semanas	
☐ CRU	Respuesta complete desconocida	Respuesta complete con persistencia de anormalidades de dudosa significacia	
☐ PR	Respuesta parcial	Reducción de la suma de los diámetros del ≥ 50% confirmada en un period ≥ 4 semanas	
☐ PD	Enfermedad en progresión	Incremento ≥20% en la suma de los diámetros o aparición de al menos una lesión nueva	
☐ NR/SD	No respuesta/Enfermedad estable	ninguno de los anteriores, o no hay suficiente diamiinución para calificar para PR ni suficiente aumento para calificar para PD, tomando como referencia la suma más pequeña del diámetro más largo desde que comenzó el tratamiento	

Notas:

Marcadores tumorales analizados por rutina ☐ Desconocido ☐ no

Fecha	Marcador tumoral	Valor	Unidad	Rangos de referencia	Desviación
	PSA				☐ S ☐ I ☐ Normal
	CA19-9				☐ S ☐ I ☐ Normal
	CEA				☐ S ☐ I ☐ Normal
	CA125				☐ S ☐ I ☐ Normal
	CA15-3				☐ S ☐ I ☐ Normal

Medicación actual

☐ No ☐ Desconocida

	Nombre del medicamento	Fecha de inicio	Fecha de fin
1			
2			
3			
4			
5			

Extracción sanguínea:

Fecha:____/_____/_____

Hora:_____:____

Total sangre EDTA :____ml

Técnica : ☐ Punción arterial

☐ Cateter central

☐ Venopunción

Desviación de protocolo: ☐ No muestra

Plasma:_____ml

PBMC:_____ml

1.2 Plantilla recogida de datos: Extracción sanguínea

Fecha extracción: **Identificación del paciente (pegatina):**

Visita:

- Pre-cirugía
- Post-cirugía
- 6 meses
- 1 año
- 2 años

N.º de caso codificado:
ml EDTA al inicio: **ml Suero:**
Procedencia de la sangre (arterial o venosa):

Item	Hora
Puesta en hielo de la sangre	
Inicio de extracción suero	
Fin extracción suero	
Inicio purificación PBMCs	
Fin purificación PBMCs	
Inicio de conteo PBMCs	
Fin conteo PBMCs	

1.3 Plantilla recogida de datos intraoperatorios

Fecha: **Identificación del paciente (pegatina):**

Procedimiento quirúrgico:

Tipo de cirugía (abierta/laparoscopia…):

Item	Hora
Inicio Anestesia	
Inicio Cirugía (primer corte)	
Fin Cirugía	
Inicio resección (primera maniobra para la extirpación del tumor)	
Fin resección	
Pieza Ex-vivo	
Ligadura de vasos (incluir nombre del vaso): 1. 2. 3. 4. 5. 6.	 1) 2) 3) 4) 5) 6)

Nota: llamar al equipo de EECC de Oncología para recoger los tubos de sangre y 30 minutos antes de la obtención de la pieza quirúrgica al **255679, 250512** o **251791.**

1.4 Plantilla recogida de datos: Anatomía Patológica

Fecha: **Identificación del paciente (pegatina)**

N.º de biopsia asignado:

Peso inicial tejido sano:

Peso crioviales con muestra de tejido sano:

- Tn7: Tn8:

Peso inicial tejido tumoral:

Peso crioviales con la muestra tumoral (izda frozen; drcha formalina):

- Tp1: Tp11:
- Tp2: Tp12:
- Tp3: Tp13:

Nota: Peso criovial vacío: 1,87 mg

Item	Hora
Muestras en nitrógeno	
Muestras en formalina	
Inicio de tallado	

ANEXO 2: Carta de invitación al paciente para participar en el estudio

SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela Santiago de Compostela

Estimado paciente

Su cirujano/a le ha indicado que es usted un posible candidato/a a participar en el **estudio TITANIA**. Para recibir más información sobre el estudio diríjase a:

Hospital de Día - Servicio de Oncología

Planta 0 Control D

En el mostrador, entregue este papel e indique que pregunten por:

Alba Turégano

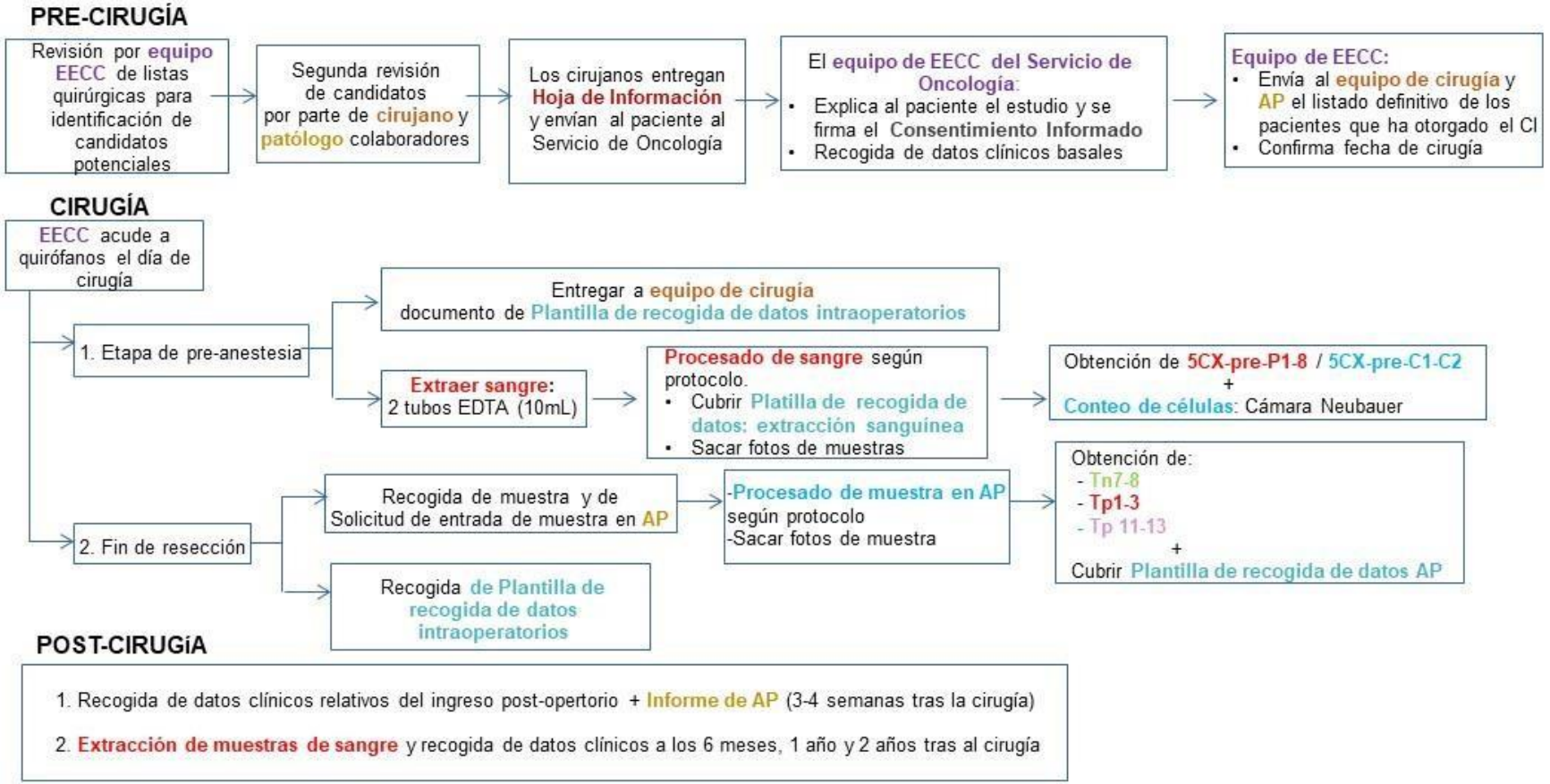
Silvia García

Ext. 255 679 / 250 512

Muchas gracias por su colaboración.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO 3: Circuito de trabajo para el desarrollo del proyecto en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.



ANEXO 4: Hoja de información para el paciente y Consentimiento Informado

Hoja de información para el paciente. V. 1.2. (6 de Mayo de 2020)

Título del estudio: mulTi omIcs daTa cANcer dIAgnostics therApies (Estudio TITANIA)

Patrocinador: Indivumed GmbH. Falkenried 88, 20251 Hamburgo, Alemania

Protocolo: IND - CAN - 2019-01

Investigador principal del centro: … …… ..

Contacto telefónico:…… ……..

Su médico le ha propuesto participar en un estudio clínico porque padece un determinado tipo de cáncer. En este documento encontrará información detallada que le permitirá evaluar si desea participar o no en este estudio. En cualquier caso, debe saber que su participación es gratuita y voluntaria y que, independientemente de la decisión que tome, esta decisión no tendrá influencia alguna en el tratamiento que reciba, y no influirá en su relación con el equipo médico que lo trata. En el caso de que desee retirar su consentimiento de participación en el estudio, no se agregarán datos nuevos a la base de datos y todas las muestras biológicas identificables previamente retenidas, si las hay, se destruirán para evitar la realización de nuevos análisis.

1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Indivumed es una compañía de oncología global integrada, que está liderada por médicos. Indivumed busca desvelar los complejos mecanismos del cáncer, a fin de apoyar la oncología de precisión y buscar nuevas formas para el desarrollo de diagnósticos y terapias. Solo un enfoque multiómico (basado en genómica, proteómica y, en general, diferentes técnicas de biología molecular) puede lograr este objetivo, pero para que las aproximaciones multiómicas sean fiables requieren sobre todo de bioespecímenes y datos de muy alta calidad. Mediante el análisis de un gran número de muestras biológicas de pacientes, se podrán identificar las características únicas (individuales) de los cánceres con el objetivo de ofrecer un tratamiento más personalizado y, por lo tanto, más eficaz para tratamientos individualizados en un futuro. Además de las muestras biológicas, los datos clínicos de los pacientes se recopilarán y almacenarán en forma codificada, es decir, sólo su médico sabrá en todo momento a quien corresponde esa codificación

2. ¿QUÉ REPRESENTA SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO?

El tejido que se haya obtenido durante la cirugía médica a la que se somete se enviará al departamento de patología y se analizará allí. Este análisis es estrictamente necesario para el examen exacto de su enfermedad. Una parte de este tejido ya extraído, que no es utilizado para su tratamiento médico (tejido sobrante), incluyendo tejido tumoral y adyacente no tumoral, será compartido con Indivumed. Se garantiza que esto no perjudicará el examen

USC DE COMPOSTELA

patológico. Igualmente se extraerá sangre (por extracción de no más de 50 ml ó 3-4 cucharadas soperas) a través de un catéter ya existente, o por punción de la vena.

El personal hospitalario competente y específicamente entrenado recopilará, en nombre de Indivumed, sus datos clínicos relevantes (relacionados con la enfermedad) a partir de sus registros médicos, de entrevistas personales con usted en el hospital y, para algunos tipos de cáncer, de entrevistas telefónicas o por correo electrónico posteriores con usted y / o su médico cada seis a doce meses.

Entre los datos consultados y recopilados se encuentran, entre otros, afecciones preexistentes, comorbilidades, medicamentos tomados, existencia de enfermedades tumorales en la familia, algunos aspectos del estilo de vida personal y el desarrollo de la enfermedad y el tratamiento. Sus datos se codificarán inmediatamente después de su recopilación y se almacenarán electrónicamente, y posteriormente se utilizarán con fines de investigación, exclusivamente en forma de-identificada, es decir, con un número de caso asignado y sin llevar su nombre u otros identificadores personales almacenados o adjuntos. Sólo su médico sabrá en todo momento a quien corresponde esa codificación.

3. ¿EN QUÉ RIESGOS Y DESVENTAJAS INCURRE CON SU PARTICIPACIÓN?

El estudio no implicará ningún riesgo adicional, dado que todas las intervenciones que se pretende realizar, incluidas las extracciones de sangre y otros procedimientos, son parte de su atención médica.

Además de la extracción de sangre, todas las demás pruebas, ya sean de imágenes, como una tomografía computarizada o diagnósticas, como una biopsia, serán pruebas que generalmente se realizan de acuerdo con los protocolos de tratamiento establecidos en su hospital.

4. ¿DÓNDE SERÁN TRATADAS Y CONSERVADAS LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS?

Sus muestras biológicas serán analizadas por Indivumed GmbH y / o sus colaboradores europeos y / o internacionales en nombre de Indivumed (persona responsable: Eike-Christin von Leitner, Vice President oncology analytics von-Leitner@indivumed.com); Las muestras biológicas se almacenarán en instalaciones de Indivumed (Indivumed GmbH. Falkenried 88, 20251 Hamburgo, Alemania). Los datos se almacenarán en un espacio de almacenamiento seleccionado en la nube, mantenido en la UE / AELC y operado por Indivumed. Sus muestras solo se almacenarán durante el período del estudio y, una vez concluido, se destruirán.

Sus muestras biológicas se mantendrán en una forma codificada y de-identificada solo para asegurarse de que nadie, excepto el investigador principal de su hospital (número de teléfono: ……), pueda asociarlas con su identidad.

La persona responsable a la que puede contactar para obtener información o ejercer sus derechos de revocación es, por lo tanto, el investigador principal de su centro. siEso implica también, que si se detecte alguna anomalía que deba ser comunicada, será este investigador principal quien lo haga.

USC DE COMPOSTELA

5. ¿CÓMO SE UTILIZARÁN EXACTAMENTE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS Y LOS DATOS CLÍNICOS?

En el Consentimiento informado adjunto a esta Hoja de información para el paciente, se le solicitará su consentimiento para el uso de sus muestras biológicas y datos clínicos, y se le darán varias opciones con respecto al alcance del uso:

- Las muestras biológicas y la base de datos recopiladas en el estudio se utilizarán para probar y desarrollar nuevos enfoques y procesos de diagnóstico y terapéuticos relacionados con tumores sólidos. Esto requiere el análisis múltiple de moléculas de proteínas de diferente actividad, expresiones genéticas y microbiomas que se encuentran en las muestras de tejido, sangre, orina y heces. Las moléculas y los microbiomas también pueden analizarse en busca de cualquier información genética contenida directamente (ADN) o reflejos de dicha información genética (ARN). Una vez acabado el estudio, si quedaran remanentes de muestras, éstas serán destruídas.

6. ¿OBTENDRÁ USTED ALGÚN BENEFICIO POR PARTICIPAR?

Usted recibirá el mismo tratamiento y atención médica independientemente de si participa o no en el estudio. En consecuencia, no obtendrá ningún beneficio directo de su participación, excepto posiblemente alguna información relacionada con su enfermedad. Específicamente, en la posibilidad de encontrar hallazgos inesperados clínicamente relevantes que le afecten, cualquier información será únicamente proporcionada a través de su médico, ya que no podemos identificarlo personalmente, sin embargo, usted tiene derecho a decidir si quiere o no ser informado de los mismos e incluso recibir consejo genético al respecto.

La información que se proporciona, así como cualquier información obtenida del análisis de sus muestras, puede ser muy útil para mejorar el conocimiento que tenemos actualmente de su enfermedad y la progresión de la misma. Conocer toda esta información también sería muy útil para el tratamiento de otros pacientes.

Si cualquier investigación y / o desarrollo conduce a la concesión de una patente u otros derechos de propiedad intelectual, o al desarrollo de medicamentos o terapias que sean comercialmente explotables, usted no recibirá ninguna participación legal y / o financiera en dicha propiedad o derechos de explotación, productos, terapias o ingresos asociados. Debido a los principios generalmente aceptados de ética médica, el suministro de sus muestras y datos biológicos no se compensa.

7. ¿CÓMO SE PROTEGERÁ LA CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS CLÍNICOS Y QUIÉN TENDRÁ ACCESO A ELLOS?

Los datos clínicos recopilados durante el estudio serán tratados en todo momento por el personal sujeto al deber de secreto médico y no serán transferidos a nadie fuera del estudio que no sea en forma de-identificada, es decir, disociada de sus datos de identificación personal

Como se dijo anteriormente, como garantía adicional de confidencialidad, se le asignará un código numérico que solo puede ser vinculado a su identidad por el investigador principal de su centro que dirige el estudio. Solo este código se utilizará para la transferencia de muestras y datos al promotor o cualquier otro uso permitido del biobanco y / o base de datos. Además de la información personal atribuible que es inevitable y naturalmente parte de las muestras proporcionadas por el estudio ("Información natural", por ejemplo, ADN y ARN), ninguna información que lo identifique personalmente ("Identificadores", por ejemplo, nombre, dirección, número de seguro social) será nunca proporcionada a Indivumed GmbH o cualquier otro investigador.

De conformidad con la Ley Orgánica 3/2018 sobre la protección de datos personales, puede ejercer los derechos de acceso (solicitar información sobre la información sobre usted que está almacenada en la base de datos), de oposición (negarse a proporcionar los datos), cancelación (solicitar que los datos sean destruidos), rectificación (si algún dato se modifica en el tiempo o se detecta un error), limitación del tratamiento, portabilidad y revocación del consentimiento, así como la posibilidad de presentar reclamación ante la Agencia Española de protección de datos, para lo cual deberá dirigirse de forma presencial ante el servicio de atención al paciente del centro sanitario donde haya realizado el estudio, o mediante correo postal dirigido a "Servicio de Atención al Paciente" del centro, con la referencia "derechos de protección de datos", identificándose como participante del estudio y aportando fotocopia de su DNI o documento equivalente e indicando el derecho que desea ejercitar

La información clínica, epidemiológica y biológica derivada de las muestras y necesaria para realizar el estudio pasará a formar parte del archivo de .....Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela . (Número de teléfono: ……981 951 470……), durante el tiempo necesario para el desarrollo de la investigación más una extensión de 5 años para cumplir con la legislación vigente en materia de ensayos clínicos y estudios observacionales (Orden SAS/3470/2009, de 16 de Diciembre). Este es el lugar al que debe acudir para ejercer sus derechos reconocidos por el Reglamento (UE) 2016/679 delParlamento Europeo y del Consejo del 27 de abril de 2016 y la LOPD 3/2018 del 5 de diciembrede 2018.

Estos datos serán tratados y transferidos a Indivumed GmbH con el único y exclusivo propósito de llevar a cabo la investigación biomédica descrita en este documento y según lo consentido por usted, y siempre de forma encriptada, es decir, sin Identificadores.

En resumen, la custodia de los datos del estudio se llevará a cabo en los hospitales que participan (en este caso, Hospital ……Clinico Universitario de Santiago de Compostela) y seguirá los mismos procedimientos de protección de datos.
que para el resto de la información clínica. Además de esto, sus datos originales de-identificados, que carecen de identificadores, se almacenarán en una base de datos que será operada por Indivumed GmbH. Falkenried 88, 20251 Hamburgo, Alemania. Asimismo, las muestras biológicas, también desprovistas de datos personales que permitan identificarlos, se conservarán en las instalaciones de Indivumed. Las muestras biológicas serán tratadas en todo momento de acuerdo con los regímenes establecidos en RD1716 / 2011 y la Ley de Investigación Biomédica 14/2007.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ambos archivos tienen sistemas de seguridad estrictos a través de controles de acceso de uso restringido para evitar el empleo no autorizado.

8. ¿QUÉ DEBE HACER SI ACEPTA PARTICIPAR?

Si acepta participar, deberá firmar el formulario de consentimiento informado que se encuentra después de esta hoja de información. Tómese el tiempo que necesite y no dude en preguntar si tiene alguna duda o si necesita alguna aclaración adicional sobre cualquier aspecto del estudio en cualquier momento.

También debe saber que una vez que se haya otorgado el consentimiento, puede solicitar la eliminación de sus muestras biológicas en cualquier momento y sin tener que dar ninguna explicación. En este caso, cualquier muestra codificada restante se destruiría. Tanto la negativa a participar como la revocación de su consentimiento una vez otorgado no tendrían ningún impacto en la atención médica que reciba.

Esta información del paciente y la hoja de consentimiento informado estarán protegidas por los investigadores principales del estudio. Se contempla la posibilidad de que personal autorizado por las Autoridades Sanitarias Españolas y / o representantes del Comité de Ética Institucional (IEC), dentro de sus tareas legalmente reconocidas de controlar la investigación y protección de los pacientes que participan en el estudio, pueda realizar una inspección del estudio para verificar que se realiza correctamente desde el punto de vista ético y científico, siempre dentro de la más estricta confidencialidad.

9. ¿HAY ALGUIEN ENCARGADO DE REVISAR Y SUPERVISAR EL ESTUDIO?

Este estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética Institucional de su hospital. Este es un comité acreditado por su comunidad para realizar de forma autónoma revisiones independientes de estudios clínicos. Asimismo, se encargará de monitorizar el desarrollo de este estudio.

Por otro lado, el estudio será revisado y supervisado a nivel científico porque antes de incluir a cualquier paciente, el estudio se registrará en una base de datos de estudios públicos e internacionales y más tarde, una vez finalizado, los resultados obtenidos se comunicarán a través de publicaciones científicas.

10. ¿A QUIÉN PUEDE CONTACTAR SI DESEA OBTENER MÁS INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO?

Si necesita más información sobre el estudio, puede comunicarse con el investigador principal del centro …… teléfono: ……

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Formulario de consentimiento informado. V. 1.1. (11 de marzo de 2020)

Título del estudio: mulTi omIcs daTa cANncer dIAgnostics therApies (Estudio TITANIA)

Código de estudio: IND - CAN - 2019-01

Yo,..... ....

(nombre y apellido del paciente)

1. Declaro bajo mi responsabilidad que he leído y entendido completamente la Hoja de información para el paciente y acepto participar en el estudio de multiómica que se describe en el mismo.

2. He recibido una copia de la Hoja de información para el paciente y una copia de este Formulario de consentimiento informado, fechado y firmado. He recibido suficientes explicaciones sobre las características y objetivos del estudio y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Confirmo que se me ha dado tiempo y oportunidades suficientes para hacer preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas satisfactoriamente.

3. Sé que mi identidad se mantendrá en secreto con respecto al patrocinador y a cualquier investigador que use cualquier muestra o información recopilada en el estudio, y que mis muestras biológicas serán de-identificadas con un código numérico que sólo conocerá mimédico durante el desarrollo del estudio.

4. Soy libre de retirarme de este estudio en cualquier momento por cualquier motivo o sin él, sin tener que dar explicaciones y sin recibir un impacto negativo en mi tratamiento médico a partir de entonces. Después de eso, cualquier muestra codificada restante será destruida.

5. Entiendo que el objetivo del estudio genético es evaluar la población en estudio y que sus resultados no serán comunicados a mí ni a mi médico, excepto en caso de que cualquier hallazgo pueda tener una implicación significativa para mi enfermedad y que pueda haber una posibilidad real de mejorar esa condición en mí. En este caso, aún así podría rechazar la opciónde recibir dicha información.

Declaro haber sido informado sobre las medidas que se aplicarán para salvaguardar la confidencialidad y la de-identificación de toda la información proporcionada por mí en el estudio, así como sobre la posibilidad de ejercer los derechos de acceso, rectificación, supresión, oposición y portabilidad a través de una petición formal realizada a los responsablesdel Estudio en el centro de salud.

CONSENTIMIENTO 1.- OTORGO / NO OTORGO voluntariamente mi consentimiento para el uso de mis muestras biológicas y datos clínicos, incluido el uso de cualquier hallazgo y resultado de su uso respectivo dentro del alcance definido en el Apartado 5 de la Hoja de información al Paciente, es decir, para probar y desarrollar nuevos enfoques y procesos de diagnóstico y terapéuticos relacionados con tumores sólidos.

CONSENTIMIENTO 2.- SOY CONSCIENTE Y ACEPTO QUE SE ME HAGAN ANÁLISIS GENÉTICOS SI/NO.

CONSENTIMIENTO 3.- DESEO SER INFORMADO DE LOS RESULTADOS CLÍNICAMENTE RELEVANTES QUE ME PUEDAN AFECTAR SI/NO.

Estoy de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio y consiento el alcance del uso con respecto a mis muestras y datos como se describe en las secciones anteriormente marcadas por mí.

....

(fecha) (firma del paciente)

Confirmo que se me explicaron las características y el objetivo del estudio de multiómica, sus secciones y los posibles riesgos y beneficios para el sujeto cuyo nombre se detalla más arriba. El sujeto acepta participar mediante su firma en persona y fecha.

....

(fecha) (Investigador o persona que solicita la firma de participación)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO 5: Aprobación del Comité de Ética

Fundación Jiménez Díaz
Comitá de Ética de la Investigación

Anexo I

COMPOSICIÓN DEL CEIm

Presidente	Dr. Javier Bécares Martínez. Farmacéutico FJD
Vicepresidenta	Dra. Macarena Bonilla Porras. Farmacéutica FJD
Secretaria Técnica	Dra. Lucía Llanos Jiménez. Miembro Comité de Investigacion. Farmacóloga FJD
Vocales	D. Fernando Abellán-García Sánchez. Abogado Dr. Nicolás Alejandre Alba. Médico Asistencial. Oftalmología FJD Dra. Miriam Blanco Rodríguez. Médico Asistencial. Pediatría FJD Dr. Alfonso Cabello Ubeda. Médico Asistencial. Medicina Interna FJD Dr. Raúl Cordoba Mascuñano. Médico Asistencial. Hematología FJD Dra. Ana Díez Alcántara. Farmacéutico de Atención Primaria. Dirección Asistencial Noroeste Dr. Bernard Gastón Doger de Speville. Médico Asistencial. Oncología FJD Dra. Carolina Gotera Rivera. Médico Asistencial. Neumología FJD Dr. Sergio Hoyos Simón. Médico Asistencial. Oncología HRJC Dña. Maria del Mar Jiménez del Castillo. DUE FJD D. Carlos Macía de la Asunción. Lego no vinculado a la Institución Dña. Marta Marín Crespo. Abogada. Departamento Protección Datos Grupo Quiron Dr. Ricardo Pardo García. Médico Asistencial. Cirugía Digestivo FJD Dra. Lorena Pingarrón Martín. Médico Asistencial. Miembro Comité de Investigacion. Cirugía Maxilofacial HRJC Dr. Gonzalo Pizarro Sánchez. Médico Asistencial. Cardiología HUQM Dr. Francisco Javier Ruiz Hornillos. Miembro Comité de Investigacion y Miembro del Comité de Ética Asistencial. Médico Asistencial. Alergología HIE Dra. Rosa Sánchez Hernández. Médico Asistencial. Nefrología HGV Dra. Olga Sánchez Pernaute. Médico Asistencial. Reumatología FJD Dra. Sandra Zazo Hernández. Biologa. Miembro Comité de Investigacion. Anatomía Patológica FJD

Anexo ll

CENTROS E INVESTIGADORES PRINCIPALES Y COLABORADORES

Promotor: INDIVUMED GMBH

Título: "Multi-Omics data for Cancer Research and the Development of New Diagnostics and Therapies". Protocolo, Versión 1.2 de 07/05/2020; Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado,Versión 1.2. de 06/05/2020

Código de protocolo: IND-CAN-2019-01.

Fecha de actualización del anexo ll: **15 de Junio de 2020**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INVESTIGADOR PRINCIPAL	INVESTIGADORES COLABORADORES	CENTROS DE REALIZACIÓN
Jesus García-Foncillas	Federico Ro•o Todo	Hospital U. Fundación Jimenez Díaz
	Damian García Olmo	Servicio de Oncología Medica
		Servicio de Anatomía Patológica
		Servicio de Cirugía GenealyAparato Digestivo

INFORME DEL COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION

Dra. Lucía Llanos Jiménez, Secretaria Técnica del COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION DE LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ

CERTIFICA:

Que en las reuniones del CEIm-FJD que tuvieron lugar el 6 de agosto de 2019 (acta nº 15/19), 10 de septiembre de 2019 (acta nº 16/19), 28 de enero de 2020 (acta nº 02/20), y 28 de abril de 2020 (acta nº 08/20), el se evaluó el estudio referido y, ha decidido, una vez aceptadas las respuestas a las aclaraciones menores:

A P R O B A R

La propuesta del promotor INDIVUMED GMBH para que se realice el estudio titulado "Multi-Omics data for Cancer Research and the Development of New Diagnostics and Therapies". Código de protocolo: IND-CAN-2019-01. Protocolo, Versión 1.2 de 07/05/2020; Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado, Versión 1.2. de 06/05/2020.

1. En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente —Real decreto 1090/2015 y Decreto 39/94 de la CAM— para que la decisión del citado CEIm sea válida.

2. El Estudio reúne las normas éticas estándar de nuestra Institución para la realización de este tipo de estudios.

3. Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

4. El CEImFJD, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm FJD es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen.

5. Asimismo, hacemos constar que existe contraprestación económica para el centro y los investigadores.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. Además, este comité recuerda la obligación de realizar el seguimiento del estudio de acuerdo a la legislación vigente.

Lo que firmo en Madrid a 15 de junio de 2020

Lucía Llanos Jiménez
Secretaria Técnica CEImFJD

PIC138-19_FJb

C/ Isaac Peral, 42 Oficinas, . Oficina 1. 28015-Madrid
Teléfono: 91 5443720 - e-mail: celc@fjd.es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO 6: Firmas mutacionales

- *RefSig 2* y *RefSig 13*: son firmas mutacionales de variantes de un solo nucleótido (SNV) asociadas a la familia de enzimas de tipo editoras APOEBEC. Algunos miembros de esta familia son enzimas cuya función es editar el RNA sustituyendo citosina por uracilo. Estas firmas mutacionales se han puesto en relación con la inhibición del gen *ATR* en varios tumores y líneas celulares de cáncer. Dado que este gen es esencial para la supervivencia tanto de células tumorales como de células normales su inactivación curca con una alta toxicidadno beneficiosa en las células normales.
- *RefSig 3*: es una firma mutacional de tipo Indel distintiva por presentar microhomología en las uniones de deleción, que puede ayudar a identificar cánceres deficientes en recombinación homóloga (HR). Los cánceres con deficiencia de HR responden más robustamente a ciertos agentes que dañan el DNA debido a la disminución de la capacidad para reparar el daño del DNA inducido por la terapia. Las mutaciones conductoras que están altamente asociadas con *RefSig 3* son *TP53, BRCA1, BRCA2, MYC, ARID1A* y *NF1*.
- *RefSig 10*: se asocia con procesos mutacionales que dan lugar a un TMB muy elevado dentro de los cuales suele aparecer mutaciones de *POLE/POLD1*. Pese a que la presencia de mutaciones en *POLE/POLD1* se ha asociado con un peor pronóstico de la enfermedad también podrían emplearse como marcadores predictores de beneficio clínico a la terapia con inhibidores de punto de control inmunitario.
- *RefSig 17*: se ha asociado con un elevado TMB por lo que al igual que la *RefSig 10* se hipotetizó sobre el posible potencial como marcador de respuesta a la terapia con inhibidores de punto de control inmunitario de esta firmamutacional. Así mismo EECC han puesto de manifiesto que los pacientes que presentan una contribución alta a esta firma mutacional son más sensibles a los inhibidores de los reguladores del punto de control del ciclo celular WEE1 y CHK1/2.
- *RefSig 18*: está dominada por mutaciones C>A causadas por la oxidación de guanina inducida por ROS (especies reactivas del oxígeno). La amplificación de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MYCN también se ha relacionado con el aumento en la producción de ROS en algunos tumores hecho a su vez da lugar a un aumento de la expresión de esta firma mutacional. La manifestación de esta firma mutacional ha sido igualmente asociada a la presencia de mutaciones conductoras en los genes *TP53*, *APC*, *NOTCH1* y *NEF2L2*.

- *RefSig 36*: es otra firma mutacional inducida por ROS que se asocia con sensibilidad al inhibidor de la cinasa cabozantinib en varios tipos de cáncer.
- *RefSig MMR1* y *RefSig MMR2*: son firmas de SNV asociadas a la presencia de deficiencias en el sistema de reparación de errores del DNA que aparecen en tumores con inactivación de *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* o *MLH1*. Se han observado dos vulnerabilidades terapéuticas principales en los tumores con deficiencias en el MMR, siendo la primera de ellas la hipersensibilidad a la pérdida del gen de la helicasa del DNA WRN y la segunda el aumento de la sensibilidad a la inmunoterapia relacionada con un TMB elevado. Mientras que *RefSig MMR1* se asocia con mutaciones conductoras en los genes *RPL22*, *MMR2* está más relacionado con mutaciones en los genes *CTNNB1* y *ALB*. En lo que respecta a las terapias, las firmas mutacionales relacionadas con la MMR se asocian con sensibilidad a los inhibidores de la topoisomerasa, destacando en la camptotecina en CRC.
- *RefSig 11*: es una firma SNV dominada por mutaciones C>T que puede detectarse tras haber recibido tratamiento con terapias cuyo mecanismo de acción es producir daño en el DNA (quimioterapia, radioterapia). Esta mutagénesis inducida por el tratamiento puede acelerarse en pacientes cuyos tumores presentan deficiencias en ciertos procesos de reparación del DNA, sugiriendo la posible contraindicación a ciertos tratamientos.
- *RefSig PLATINUM*: las terapias basadas en platino inducen la presencia deSNVs. Además de las SNV, el cisplatino también puede inducir Indels de una sola base (tanto inserciones como eliminaciones), lo que sugiere que la terapia con platino puede limitar su propia eficacia al causar mutaciones de resistencia a los medicamentos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se originan en los tejidos del cuerpo por el sobrecrecimiento de células anormales. Por su alta incidencia y prevalencia destacan los adenocarcinomas pulmonares y colorrectales. Estas enfermedades surgen de la interacción entre factores ambientales y genéticos, por lo que conocer los mecanismos de interacción entre estos es crucial para el entendimiento y tratamiento de estas patologías. El empleo de técnicas multiómicas ha aportado una mejor comprensión de la carcinogénesis y la heterogeneidad tumoral. Esta tesis evalúa su capacidad para proporcionar un análisis más exhaustivo de las bases moleculares de ambos tumores y favorecer la predicción de la evolución y pronóstico de los mismos en pacientes previamente no tratados sometidos a cirugía radical.