

# Biomarcadores moleculares y genómica en el cáncer colorrectal (CCR)

Fernando Rivera Herrero, Carlos López López, Noelia Vega Gil

RUTINARIO	RECOMENDABLE	INVESTIGACIÓN
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Categoría I               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estado mutacional de los genes KRas y NRas (Exones 2,3 y 4)</li> <li>- Estado mutacional del gen BRaf (V600)</li> <li>- Inestabilidad de microsatélites (MSI)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Categoría IIA               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gen deleciónado en el cáncer de colon (DCC)</li> <li>- Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)</li> <li>- Células tumorales circulantes y en la médula ósea (CTC)</li> <li>- UGT1A1</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Categoría IIb (Prometedores; investigación):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Clasificación molecular CMS</li> <li>- Perfiles de expresión génica</li> <li>- Timidilato sintetasa (TS) y Timidín fosforilasa (TP)</li> <li>- Receptor de factores de crecimiento (EGFR y HER2)</li> <li>- B-RAF</li> <li>- Otros posibles biomarcadores de eficacia de antiEGFR: EREG/AREG; PIK3CA, PTEN</li> </ul> </li> <li>• Categoría III (Poco estudiados):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Otros posibles biomarcadores de eficacia de antiEGFR: Polimorfismos en FcyR, microRNAs, IGF1-R</li> <li>- Biomarcadores que intervienen en la reparación de los daños en el ADN producidos por los platinos (ERCC1, XRCC1, ERCC2, XRCC3, GADD45A) o que evitan que se produzcan dichos daños (GST)</li> </ul> </li> <li>• Categoría IV (No útiles):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Marcadores de angiogénesis</li> <li>- Marcadores de metástasis e invasión</li> <li>- Índice de proliferación</li> <li>- Gen supresor tumoral p53</li> </ul> </li> </ul>

## INTRODUCCIÓN

El factor pronóstico más importante tras la resección del CCR es el estadio patológico (pTNM). El sistema de estadificación TNM del año 2002 sólo tiene en cuenta factores relacionados con la extensión tumoral determinada por métodos clínicos y tras el estudio de la pieza quirúrgica. En los últimos años se ha identificado un importante número de marcadores moleculares, algunos de los cuales pueden influir a la hora de decidir la mejor terapia adyuvante o predecir, con mayor precisión, la evolución de la enfermedad. En 1999, el Colegio Americano de Patólogos (*College of American Pathologists, CAP*) celebró

una reunión de consenso donde se establecieron las bases para el estudio de factores biológicos, genéticos, moleculares y derivados de tejidos, como los marcadores pronósticos en el CCR (1). Se establecieron diferentes categorías en función de la evidencia demostrada como factores pronósticos:

- **Categoría I:** definitivamente demostrados como factores pronósticos según múltiples ensayos clínicos publicados y, generalmente, utilizados en la práctica clínica diaria.
- **Categoría IIA:** extensamente estudiados, desde un punto de vista biológico y/o clínico, con valor pronóstico y/o predictivo de respuesta. Estos factores son suficientemente importantes para ser incluidos en los informes de Anatomía Patológica, pero su importancia clínica aún no ha sido validada en ensayos clínicos aleatorizados.
- **Categoría IIB:** factores prometedores; no poseen suficiente información para ser incluidos en la categoría I o IIA.
- **Categoría III:** factores aún no estudiados lo suficiente como para poder determinar su valor pronóstico o predictivo.
- **Categoría IV:** factores bien estudiados y sin significado pronóstico.

### RUTINARIOS (Categoría I)

#### Estado mutacional de los genes KRas y NRas como factor pronóstico (categoría III) <sup>1,2</sup>

El valor de las mutaciones de *KRas* y *NRas*, como factor pronóstico o predictivo, se ha analizado en los pacientes con CCR tanto en la situación adyuvante como en la enfermedad avanzada. La incidencia de mutaciones de los genes *KRas* y *NRas* en el CCR se sitúa en torno al 50%. Estudios recientes no indican valor pronóstico de mutaciones de *KRas*/*NRas* en los estadios II y III de CCR. Su valor como factor pronóstico en la enfermedad avanzada es controvertido. El valor de las mutaciones de *KRas* / *NRas*, como factor predictivo de respuesta a la quimioterapia en el tratamiento adyuvante, es muy limitado, lo cual no es así en la enfermedad avanzada con anticuerpos anti-EGFR (factor de crecimiento epidérmico), en los que ha demostrado ser un factor predictivo clave. Con los datos actuales no se puede recomendar la determinación del estado mutacional de los genes *KRas* ni *NRas* en los estadios locales o locorregionales.

#### Estado mutacional de los genes KRas y NRas como factor predictivo de eficacia de los monoclonales antiEGFR (categoría I)

Ras es una familia de oncogenes que incluye *KRas*, *NRas* y *HRas*. En el CCR las mutaciones se localizan sobre todo en el exón 2 (codones 12,13) de *KRas* (en torno al 40% de los pacientes) y menos frecuentemente, y de forma excluyente, en los exones 3 (codones 59,61) y 4 (codones 117,146) de *KRas* (en torno al 10% de los pacientes que tienen *KRas* Exon 2 no mutado) y en los exones 2 y 3 y en menor medida 4 de *NRas* (otro 10% de los pacientes que tienen *KRas* Exon 2 no mutado). Globalmente aproximadamente un 20% de los pacientes que son *KRas* exón 2 no mutado, tienen alguna de estas “otras” mutaciones en *K-NRas*.

### Mutaciones en KRas exón 2 y resistencia a monoclonales antiEGFR

Dado que cuando Ras se encuentra mutado la transmisión de la señal se activa patológicamente por debajo del receptor EGFR se postuló que estas mutaciones podrían implicar resistencia a los monoclonales antiEGFR (panitumumab y cetuximab). En un principio se estudiaron sólo las mutaciones en KRas Exón 2 (la localización más frecuente de las mutaciones activadoras de Ras en CCRm) y algunos análisis retrospectivos de estudios fase II sugerían un posible valor predictivo negativo para eficacia de cetuximab. Sin embargo para establecer de una forma sólida el valor como biomarcador de estas mutaciones en KRas exón 2 era preciso su validación en un estudio randomizado y esto se hizo en el estudio 20020408 que es un Fase III que comparó panitumumab vs tratamiento sólo de soporte en pacientes con CCRm refractarios a quimioterapia. En este estudio se randomizaron 463 pacientes, observándose en el global del estudio un aumento significativo en SLP (HR 0,54) y respuesta con panitumumab, observándose el beneficio con panitumumab sólo en los pacientes con KRAS exón 2 no mutado (PFS, HR: 0,45) <sup>3</sup> no viéndose diferencias al administrar panitumumab en los pacientes con mutaciones. También se confirmó posteriormente este valor predictivo negativo para eficacia de panitumumab de las mutaciones en KRas exón 2 en CCRm en la primera línea en combinación con FOLFOX (Fase III PRIME <sup>4</sup>: efecto deletéreo al añadir panitumumab en mutados; beneficio en SLP, Rta y Sv en no mutados) y en la segunda línea en combinación con FOLFIRI (Fase III 181 <sup>5</sup>: similar eficacia al añadir panitumumab en mutados; beneficio en SLP y Rta y tendencia en Sv, en no mutados) o con irinotecán (Fase III PICCOLO <sup>6</sup>: efecto detrimental al añadir panitumumab en mutados; beneficio en SLP y tendencia en Sv, en no mutados).

Hallazgos similares en cuanto al valor de las mutaciones en KRas exón 2 como biomarcador de no eficacia en CCRm se observaron con Cetuximab tanto en tercera línea (fase III NCIC CO.17 <sup>7</sup>) como en primera (fase III CRYSTAL <sup>8</sup> y fase II randomizado OPUS <sup>9</sup>).

### “Otras” mutaciones en Ras (K-N Ras) y resistencia a monoclonales antiEGFR

Como ya se comentó antes, en torno al 20% de los pacientes con K Ras exón 2 no mutado tienen “otras” mutaciones en KRas (exones 3,4) o en NRas (Exones 2,3,4). Desde un punto de vista teórico estas otras mutaciones en Ras podrían implicar también resistencia al tratamiento con monoclonales antiEGFR en CCRm pero para validar esto era preciso disponer de estudios randomizados adecuados y el primer estudio en que se ha realizado un análisis de esta cuestión ha sido el PRIME <sup>10</sup>. En este estudio fase III se randomizaron 1183 pacientes con CCRm en primera línea a ser tratados con FOLFOX vs FOLFOX-panitumumab. El objetivo principal era la SLP y se incluía en el diseño el análisis del valor predictivo de las mutaciones en Ras (se dispuso de dicho análisis en 1096 pacientes). Ya se comentó antes cómo en un primer momento se analizaron sólo las mutaciones en KRas exón 2 y se observó como en presencia de estas el añadir panitumumab resultaba detrimental (SLP: HR 1,27, p 0,02), aumentando en cambio la eficacia en los KRas exón 2 no mutado (SLP, Rta y Sv). Posteriormente lo que se hizo fue determinar en 639 de los 656 pacientes sin mutaciones en KRas exón 2 la existencia de “otras” mutaciones en K-NRas. Se hizo de forma paralela mediante secuenciación Sanger y el test de Transgenomic (WAVE-based surveyor), siendo concordantes los resultados y observándose globalmente “otras” mutaciones en el 17% de los pacientes (4% KRas exón 3; 6% KRas exón 4; 3% NRas exón 2 y 4% NRas

exón 3). En estos 108 pacientes con “otras” mutaciones en K-NRas se vieron de nuevo resultados que tendían a ser detrimentales al añadir panitumumab (SLP, HR: 1,28,  $p=0,32$ ), concentrándose el beneficio con panitumumab en los pacientes sin mutaciones en K-NRas, tanto en SLP (mediana 10,1 vs 7,9 m; HR 0,72,  $p=0,004$ ) como en supervivencia (mediana 25,8 vs 20,2; HR 0,77,  $p=0,009$ ). A raíz de la publicación de este hallazgo la ficha técnica del panitumumab fue modificada en el 2013 limitando la indicación de panitumumab sólo a los pacientes con CCRm y sin mutaciones en K-NRas. Posteriormente se ha comunicado también falta de eficacia del panitumumab en el subgrupo de pacientes con KRas exón 2 no mutado pero con “otras” mutaciones en K-NRas en otros estudios randomizados como en el anteriormente mencionado fase III de panitumumab en tercera línea 20020408 <sup>11</sup> o en el Fase III 181 que exploró en segunda línea el añadir o no panitumumab a FOLFIRI <sup>12</sup>

Con respecto al valor predictivo negativo de eficacia de cetuximab de las mutaciones en K-NRAS, también se demostró en el análisis de dichas mutaciones realizado en los estudios OPUS <sup>13</sup> (F II randomizado que comparó FOLFOX vs FOLFOX-cetuximab) y CRYSTAL <sup>14</sup> (F III que comparó FOLFIRI vs FOLFIRI-cetuximab) y en la EMA modificó también la ficha técnica del cetuximab restringiéndose su indicación a los pacientes sin mutaciones en K-NRAS.

Si bien el valor predictivo negativo de las mutaciones en K-NRAS para eficacia de los monoclonales antiEGFR está establecido, en cambio la secuencia óptima de biológicos en los pacientes con K-NRAS no mutado no está clara. Existen tres estudios randomizados que han comparado en primera línea de CCRm quimioterapia +bevacizumab vs quimioterapia+monoclonal antiEGFR en este contexto.

1. El fase II randomizado PEAK <sup>15</sup> randomizó 285 pacientes con CCRm KRas exón 2 no mutado en primera línea a FOLFOX-panitumumab vs FOLFOX-bevacizumab. El objetivo principal era la SLP y en el global de los pacientes incluidos no se vieron diferencias significativas (10.9 m vs 10.1m respectivamente; HR 0.84,  $p=0.22$ ). Sin embargo cuando se analizaron otras mutaciones en K-NRAS (fue posible analizarlas en 221 pacientes y el 23% tenían mutaciones) se vio una SLP significativamente superior en el brazo con panitumumab en los 170 pacientes sin mutaciones en K-NRAS (13 m vs 10.1 m, HR 0.66,  $p=0.03$ ) mientras que en los 51 pacientes con otras mutaciones en K-NRAS la SLP tendía a ser mejor en el brazo con bevacizumab (8.4m vs 8.8m, HR 1.13,  $p=0.68$ ).
2. El fase III FIRE-3 <sup>16</sup> randomizó 705 pacientes con CCRm (592 eran KRas exón 2 no mutado; en 407 de estos pacientes se pudo analizar la presencia de “otras” mutaciones en K-NRAS y 65 pacientes -el 16%- las presentaban) en primera línea a ser tratados con FOLFIRI-cetuximab vs FOLFIRI-bevacizumab. En este análisis se sugiere también un valor predictivo negativo para tratamiento con cetuximab de las “otras” mutaciones en K-NRAS siendo la tasa de respuestas (objetivo principal del estudio) según revisión central superiores en el brazo de cetuximab, y también significativamente superior la supervivencia en dicho brazo, aunque la SLP fue similar.
3. Recientemente se comunicaron los resultados del fase III CALGB/SWOG 80405 <sup>17</sup> que randomizó a pacientes con CCRm en primera línea a quimioterapia (FOLFOX o FOLFIRI) con cetuximab vs bevacizumab. Se randomizaron un total de 1137 pacientes K-RAS exón 2 no mutado viéndose similar supervivencia (objetivo principal) en ambos brazos y se comunicó el análisis parcial de los resultados en los pacientes K-NRAS no

mutados que incluyó 526 pacientes. En este subgrupo de pacientes seguía sin verse diferencias estadísticamente significativas en supervivencia ni en SLP aunque sí se vieron más respuestas con cetuximab

### Determinación de biomarcadores para anti-EGFR en sangre periférica (“biopsia líquida”)

Existen estudios que sugieren que el estatus mutacional de KRas del tumor en CCRm puede ser fiablemente determinado en sangre periférica (correlación con estatus mutacional en biopsia tumoral >90%), bien determinándolo en CTCs <sup>18</sup>, o bien determinándolo en DNA tumoral libre circulante <sup>19</sup>. Igualmente podrían detectarse en sangre periférica otros biomarcadores tumorales que ahora determinamos en el tumor y esto facilitaría mucho la aplicación en la clínica de estos biomarcadores e incluso su determinación repetida a lo largo del tiempo buscando cambios dinámicos en el tumor.

### Aparición de mutaciones en Ras tras tratamiento con monoclonales anti-EGFR

Se han publicado recientemente estudios <sup>20, 21</sup> que sugieren que en CCRm originalmente sin mutaciones en Ras, tras el tratamiento con monoclonales antiEGFR, en el 38-60% de los pacientes aparecen mutaciones en Ras tras una mediana de 5-6 meses de tratamiento, posiblemente por una selección de clones resistentes. La aplicabilidad clínica de este hallazgo en el sentido de posibles cambios en el tratamiento tras la detección de estas mutaciones “de novo” en Ras está por determinar, pero sin duda es una línea de investigación interesante para el futuro.

### Métodos de determinación

- Secuenciación (Sanger, masiva...)
- Pirosecuenciación
- WAVE-based SURVEYOR® Scan Kits deTransgenomic
- RT-PCR
- Técnicas de alta sensibilidad (PCR Digital plataforma Fluidigm, BEAMING...)

### **Recomendación**

*Se deben determinar las mutaciones en KRas y NRas en todo paciente con cáncer colorectal metastásico candidato a ser tratado con monoclonales antiEGFR (Cetuximab o panitumumab).*

*Dado que estos monoclonales no han demostrado eficacia como tratamientos complementarios en el contexto de la enfermedad resecable (estadios II, III o tratamiento perioperatorio en metástasis resecables), determinar las mutaciones de KRas/NRas no es necesario en estos contextos*

*La utilidad de la determinación en sangre del estado mutacional de KRas/NRas no está todavía adecuadamente validada, ni tampoco la de monitorizar de forma dinámica cambios en el estado mutacional durante el tratamiento con antiEGFR por lo que no se recomienda su uso fuera del contexto de un ensayo clínico.*

### Estado mutacional del gen BRAF (V600) en Enfermedad avanzada (valor pronóstico y predictivo. Categoría I)

Las mutaciones en BRAF en CCR son V600, (BRAF<sup>V600</sup>), se dan en aproximadamente un 10% de los CCR y son casi siempre excluyentes con las mutaciones en RAS. En un metanálisis <sup>22</sup> se analizó la asociación de las mutaciones en BRAF con factores clínico-patológicos en CCR. Se incluyeron 25 estudios con 11,955 pacientes con CCR. El porcentaje de pacientes con mutaciones en BRAF<sup>V600E</sup> fue 10.8% (1288/11955). Las mutaciones en BRAF<sup>V600E</sup> se asociaron a: KRAS wt (17% vs 1.2%; OR 14.28), estadio TNM avanzado (11.6% vs 8% ; OR 1.59), pobre diferenciación (25.6% vs 8% ; OR 3.89), histología mucinosa (19.4% vs 8.1% ; OR 2.99), MSI (38.9% vs 9.3% ; OR 8.18), fenotipo metilador (45.9% vs 9.1% ;OR 16.44), Metilación en el promotor de MLH1 (62.5% vs 9.2% ;OR 13.84), mujeres (13.7% vs 8% ;OR 1.71), edad más avanzada (>60 y; 18,6% vs 6,7% ;OR 2.29) y colon proximal (21.6% vs 4.8% ;OR 4.85)

Las mutaciones en BRAF en la enfermedad resecable, en un análisis realizado sobre los pacientes incluidos en el PETACC-3, se asoció a un peor pronóstico para supervivencia, pero solo en los pacientes que no tenían MSI (HR 2.2 (1.4-3.4) ; p 0.0003) <sup>23</sup>.

En la enfermedad avanzada las mutaciones en BRAF se asocian claramente a un peor pronóstico con medianas de supervivencia en estudios modernos de tan solo en torno a los 12 meses (frente a más de 24 meses en los pacientes sin mutaciones en BRAF).

No está tan claro sin embargo si las mutaciones en BRAF identifican o no a un subgrupo de pacientes que no se beneficiaría con de los monoclonales antiEGFR. Dos meta-análisis recientemente publicados han intentado contestar esta cuestión:

- En el meta-análisis de Pietrantonio y cols <sup>24</sup> se incluyeron 9 estudios que habían randomizado 463 pacientes con CCR metastásico BRAF mutado a ser tratados o no con monoclonales antiEGFR. Globalmente no se vio un aumento significativo en la eficacia al añadir antiEGFR ni en SLP (HR, 0.88; IC 95%: 0.67-1.14; p=0.33), ni en supervivencia (HR, 0.91; IC 95%: 0.62-1.34; p=0.63) ni en la tasa de respuestas (OR: 1.31; IC 95%: 0.83-2.08, p=0.25).
- En el meta-análisis de Rowland y cols <sup>25</sup> se incluyeron 7 estudios que habían randomizado 351 pacientes con CCR metastásico BRAF mutado a ser tratados o no con monoclonales antiEGFR. Cuando se miraba solo al subgrupo de pacientes con BRAF mutado, de nuevo no se veía un aumento significativo en la eficacia al añadir antiEGFR ni en SLP (HR, 0.86; IC 95%: 0.61-1.21; p=0.38), ni en supervivencia (HR, 0.97; IC 95%: 0.67-1.41; p=0.88). Sin embargo en este meta-análisis a diferencia del de Pietrantonio, también se consideraban los pacientes con BRAF no mutado (en estos se veían mejorías significativas el SLP, Sv y Rtas) y se estudiaba mediante un test de interacción si las diferencias en eficacia observadas al añadir antiEGFR en los subgrupos BRAF mutado y no mutado podían explicarse al azar. Se vio que dicho test de interacción no alcanzaba la significación estadística en el caso de la supervivencia (p 0,47)

y solo la rozaba en el de la SLP (p 0,07). Concluyen los autores que en este meta-análisis no se puede excluir un beneficio con monoclonales antiEGFR en CCR con mutaciones en BRAF. Sin embargo hay que señalar que con el escaso número de pacientes BRAF mutado incluido, lo heterogéneo de los estudios y la influencia posible de otras líneas es difícil que el test de interacción alcanzase la significación estadística en el caso de que realmente los antiEGFR no beneficiasen a los pacientes con BRAF mutado y que cuando se dan estas limitaciones una  $p < 0,1$  para el test de interacción puede ser aceptable (en el caso de la SLP es 0,07). En todo caso el beneficio con antiEGFR en pacientes con BRAF mutado parece dudoso y posiblemente sería mínimo y clínicamente poco relevante.

No está pues claro cual puede ser el tratamiento más adecuado para los pacientes con CCR avanzado con BRAF mutado:

- El beneficio con monoclonales anti EGFR, como acabamos de ver, parece ser muy dudoso y en todo caso mínimo.
- El tratamiento con FOLFOXIRI-bevacizumab, en un análisis de subgrupos del Fase III TRIBE<sup>26</sup> presentó resultados interesantes en el subgrupo de pacientes con BRAF mutado (SLP y Sv mediana: 7,5 m y 19 m con FOLFOXIRI-BEVA vs 5,5 m y 10,7 m con FOLFOXIRI, HR 0,56 y 0,54, p NS) pero tan solo se randomizaron 53 pacientes en este subgrupo, y esto limita mucho la interpretación de estos resultados
- Se está explorando el posible papel de los TKI antiBRAF. A diferencia de lo que sucede en los melanomas, los anti-BRAF solos no son eficaces en CCR. Existen datos preclínicos que sugieren que la sobreexpresión de EGFR pudiese actuar como mecanismo de escape a los antiBRAF en CCR. Existen datos preclínicos y clínicos iniciales prometedores con las combinaciones de Anti-BRAF + Anti.EGFR Mab +/- 3ª droga (Anti-MEK; Anti-PIK3CA ; Anti-ERK...)
- Está pendiente de estudiar la posible utilidad de inmunomoduladores en CCR con BRAF mutado cuando se asocian a MSI

### Inestabilidad de los microsatélites (MSI) (categoría I)<sup>27-32</sup>

La presencia de mecanismos defectivos en la reparación de cruzamientos de ADN produce alteraciones somáticas en el tamaño de las secuencias simples repetitivas de nucleótidos (microsatélites). Este fenómeno, conocido como MSI, viene determinado fundamentalmente por el silenciamiento de los genes reparadores MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Todos los pacientes con síndrome de Lynch y un 15% de los CCR esporádicos tienen MSI. El *National Cancer Institute* (NCI) ha propuesto un panel de cinco microsatélites para la definición del MSI: son tumores con alta frecuencia de MSI (MSI-H) si dos o más marcadores tienen inestabilidad; tienen baja frecuencia de inestabilidad si sólo tienen un marcador inestable (MSI-L) y son tumores con marcadores estables los MSS. En la práctica clínica la inestabilidad se mide, fundamentalmente, por la determinación inmunohistoquímica (IHC) de las proteínas reparadoras de DNA, hMLH1, hMSH2, hMSH6 y hPMS2.

Globalmente, la MSI se presenta en aproximadamente el 15-20% de los CCR estadio II, en el 10% de los estadios III, y en algo menos del 5% de los pacientes con estadio IV. La MSI se da en aproximadamente el 15% de los CCR esporádicos y en la mayoría de los asociados a síndrome de Lynch.

### MSI en Enfermedad resecable:

Numerosos estudios han determinado el valor pronóstico de los tumores con MSI-H. Tanto en estadios II y III, la presencia de MSI confiere un mejor pronóstico. Hay estudios que sugieren un valor predictivo negativo para los pacientes con tumores MSI-H al recibir tratamiento adyuvante con fluoropirimidinas. Con respecto al beneficio con oxaliplatino adyuvante en los pacientes con MSI, algún estudio que sugiere que sí podría aportar beneficio aunque los datos son limitados. El estudio ECOG 5202 podría ayudar a aclarar mejor el valor pronóstico y predictivo del MSI.

### MSI en Enfermedad Avanzada

La MSI en la enfermedad avanzada, ha sido asociada a un peor pronóstico, al contrario de lo que sucede en la enfermedad resecable.

La presencia de MSI identifica tumores con defectos en la reparación del DNA con gran número de mutaciones (tumores hipermutados), que se asocian con la expresión de gran número de epítopos que implican una importante inmunogenicidad de este subgrupo de tumores. La presencia de MSI es un biomarcador que predice eficacia de inmunomoduladores (check point inhibitors) como el pembrolizumab (monoclonal inhibidor de PD-1). En un estudio fase II recientemente publicado<sup>32</sup> se evaluó en 41 pacientes con CCR metastático refractario la actividad de pembrolizumab en monoterapia. Se incluyó una cohorte de pacientes con MSI y otra sin MSI. Los dos objetivos principales eran la Respuesta (Immune-related-RR) y la Immuno-related PFS a 20 semanas. Se vio una actividad muy importante en la cohorte de pacientes con tumores con MSI (Ir-RR 40%, Ir-PFS 20 s: 78%; Medianas de Supervivencia y SLP no alcanzadas) y en cambio no se vio actividad en los pacientes con tumores sin MSI (Ir-RR 0%, Ir-PFS 20 s: 11%; Medianas de Supervivencia 5 m y SLP 2,2 m)

En el mismo estudio se incluyó una tercera cohorte de pacientes con tumores digestivos no colorectales con MSI, observándose también en estos pacientes una importante actividad (Ir-RR 71%, Ir-PFS 20 s: 67%)

En la actualidad se está investigando el papel de pembrolizumab (estudio Fase III en primera línea –KEYNOTE 177-, y fase II en pacientes refractarios –KEYNOTE 164-) y de otros check point inhibitors en el tratamiento del CCR con MSI

### MSI y síndrome de Lynch

La MSI es consecuencia de la pérdida de expresión de las proteínas reparadoras de DNA (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) por el silenciamiento de sus genes. Dicho silenciamiento puede deberse a la metilación de su promotor (tumores hipermetilados) siendo estos casos esporádicos y asociándose el 50% de estos casos a mutaciones en BRaf. El otro

mecanismo de silenciamiento de estos genes reparadores es por mutaciones germinales, lo cual se da en el síndrome de Lynch (también conocido como cáncer colorectal hereditario no asociado a poliposis, o HNPCC por sus siglas en inglés). Se utiliza la presencia de MSI asociada a no mutaciones en B-Raf, para identificar pacientes con posible síndrome de Lynch.

### Gen deleccionado en el cáncer de colon (DCC) (categoría IIA)<sup>33, 34</sup>

Este gen se halla localizado en el brazo largo del cromosoma 18 (18q) y codifica una proteína DCC relacionada con el proceso de adhesión. La evaluación de ese gen y proteína se ha realizado bien por técnicas genéticas moleculares en las que se ha evaluado la pérdida de heterogeneidad (LOH) de 18q o por técnicas de IHC, midiendo el nivel de DCC. La medición de pérdida de DCC por IHC ha sido evaluada en menos estudios, con valores no tan concluyentes. Con respecto a LOH de 18q, ésta ha demostrado ser un factor pronóstico desfavorable en diversos estudios, en algunos de ellos con valor independiente, sobre todo en estadio II. Sin embargo, LOH de 18q no ha sido determinado de forma clara como factor predictivo de respuesta al tratamiento adyuvante. Los datos de que disponemos sugieren que la determinación de LOH de 18q se debería incorporar en la nueva generación de estudios adyuvantes, tal como se está haciendo en el estudio del grupo ECOG 5202 (conjuntamente con la inestabilidad de microsatélites). El hecho de que esta técnica no esté bien estandarizada hace que se deba hacer en laboratorios centralizados. Mención aparte merece la posibilidad de determinar polimorfismos en los genes localizados en 18q, aunque los datos en este sentido son muy incipientes.

### Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) (categoría IIA)

Es la principal enzima en el catabolismo del 5FU, convirtiéndolo en un metabolito inactivo, el dihidrofluorouracilo (DHFU).

#### Métodos de determinación

- ELISA.
- IHQ.
- Nivel de expresión (ARNm) por PCR.
- Polimorfismos/mutaciones.
- Test de inhalación de uracilo.

#### Utilidad clínica: valor pronóstico y valor predictivo

Está bastante establecido su valor como predictor de toxicidad con las fluoropirimidinas y esta faceta es lo que hace que su utilización se considere como recomendable.

Existe una variabilidad interindividual importante (8-21 veces) en el nivel de actividad de la DPD, correlacionándose niveles más bajos con una mayor toxicidad con las fluoropirimidinas<sup>35</sup>. Entre un 4-7% de la población padece un síndrome de deficiencia de DPD que sólo se manifiesta cuando estos pacientes son tratados con fluoropirimidinas, momento en el que desarrollan una importante toxicidad (gastrointestinal, hematológica y neuroló-

gica) que puede ser incluso letal<sup>36</sup>. En parte de estos pacientes el déficit de DPD se debería a ciertas mutaciones/polimorfismos (sobre todo la mutación IVS14+ 1G > A, DPyD\*2<sup>a</sup>, que se da en torno al 2% de la población<sup>37</sup>), y también se ha sugerido en otros pacientes un papel de la hipermetilación en los promotores de DPD <sup>38</sup>.

En los últimos años se están desarrollando distintas técnicas que tratan de identificar estos pacientes con defecto de actividad de la DPD, siendo una de las más interesantes el test de inhalación de uracilo<sup>39</sup>. Sin embargo, dicho test debe ser adecuadamente estandarizado y validado antes de poder considerar su uso como rutinario.

En cuanto al valor predictivo de eficacia, el nivel de actividad de DPD en el paciente y su nivel de expresión en el tumor (ARNm y proteína), así como ciertos polimorfismos, también han mostrado en numerosos estudios poseer un valor predictivo de eficacia de las fluoropirimidinas (mayor expresión de DPD implica menor eficacia), si bien en este aspecto la utilidad de DPD como biomarcador no está clara <sup>40</sup> ya que estos datos están basados en estudios retrospectivos y deberán ser evaluados en estudios clínicos prospectivos antes de que puedan ser trasladados a la práctica clínica diaria. También se ha sugerido que una mayor expresión intratumoral de DPD podría ser un factor menos adverso para las fluoropirimidinas que incorporan un inhibidor de DPD (como el UFT o el S1) que para aquellas otras que no lo incorporan (el 5FU, la capecitabina o el ptegafur), si bien la implicación real desde el punto de vista clínico de esto tampoco está clara.

### Recomendación

*Sería recomendable una mayor estandarización y validación de métodos como el test de inhalación de uracilo para excluir a los pacientes con déficits severos de DPD del tratamiento con fluoropirimidinas; pero, mientras esto no sea así, no se puede considerar su utilización como rutinaria. Se aconseja su determinación especialmente cuando tras una importante toxicidad con fluoropirimidinas se plantea seguir utilizándolas.*

*En cuanto a DPD como biomarcador predictivo de eficacia, no se considera aconsejable su uso fuera de los ensayos clínicos.*

### Células tumorales circulantes (CTC) <sup>41</sup>y en la médula ósea

#### Células tumorales circulantes (CTC) (enfermedad resecable) (categoría III)

Estudios limitados han sugerido que tanto la presencia de células tumorales circulantes como en la médula ósea tienen un valor pronóstico desfavorable en el CCR precoz<sup>42</sup>. El hecho de que son pocos los estudios y con un número pequeño de pacientes, utilizando técnicas diferentes, hace que de momento sea una determinación experimental.

#### Células tumorales circulantes (CTC) (enfermedad avanzada) (categoría IIA)

Se ha sugerido que la identificación y cuantificación de CTC en sangre periférica puede ser un factor pronóstico en el CCRm. En el estudio MACRO que trató a pacientes con CCRm en primera línea con XELOX-Bevacizumab se observó que la detección y cuantificación de CTC en sangre periférica, permitía predecir la SLP y la SG <sup>41</sup> Pacientes con 3

o más CTC en sangre periférica, antes de iniciar tratamiento, tienen una peor SG que aquellos pacientes con un menor recuento de CTC (<3 CTC). Además, aquellos pacientes, que durante el tratamiento presentan un descenso en el número de CTC (<3 CTC), alcanzan una mejor SG que aquellos con un recuento de CTC  $\geq 3$  CTC a pesar del tratamiento. Estos datos sugieren que el recuento de CTC puede ser un factor pronóstico en los pacientes con CCRm y puede ser útil en la monitorización de la respuesta al tratamiento.

### Polimorfismo de UGT1A1 (categoría IIA)

UGT1A1 es una enzima que juega un papel importante en el metabolismo del CPT-11, pues glucuroniza (inactivándolo) a su metabolito activo, el SN-38.

Métodos de determinación

- Polimorfismos.

### Utilidad clínica: valor pronóstico y valor predictivo <sup>43-47</sup>

La actividad de UGT1A1 varía hasta 17 veces entre individuos, y entre los principales responsables de esta variabilidad (aunque también existen otros factores) están los polimorfismos en la región TATA del promotor de UGT1A1 (UGT1A1\*28). El número más habitual de repeticiones de TA es de 6, siendo la mayor parte de los individuos homocigotos 6/6. Cuando hay 7 repeticiones en uno de los alelos (heterocigotos 7/6), pero sobre todo cuando esto sucede en los dos alelos (homocigotos 7/7), se reduce la expresión del gen y, por tanto, se glucuroniza menos el SN-38, acumulándose y produciéndose una mayor exposición al mismo con el consiguiente aumento en la toxicidad. La identificación de estos homocigotos 7/7 es importante en el caso de que contemplemos la utilización de CPT-11, pues en estos pacientes deben usarse dosis menores para evitar toxicidades excesivas. La frecuencia de los homocigotos 7/7 es variable según la zona geográfica (5-15% de la población caucásica, 12-27% de los africanos, 19-24% de los indios, 1-2% de los asiáticos).

#### Recomendación

*Sería recomendable determinar los polimorfismos en UGT1A1\*28 en aquellos pacientes que van a ser tratados con CPT-11 y utilizar dosis reducidas en aquellos que fuesen homocigotos 7/7. Sin embargo, existe debate sobre su utilidad real, pues la determinación de este polimorfismo no excluye la posibilidad de que, finalmente, se acabe produciendo una toxicidad importante con CPT-11 dado que también existen otros factores. Es por ello que su uso no está extendido en todos los ámbitos y no puede considerarse como un biomarcador que deba realizarse de forma rutinaria (sería sólo recomendable) en todo paciente que vaya a ser tratado con CPT-11.*

## INVESTIGACIÓN (Categoría IIB)

### Subtipos del consenso de subtipos moleculares (consensus molecular subtypes – CMSs) <sup>48</sup>

El CCR es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista biológico. Existían varias clasificaciones del CCR desde el punto de vista molecular y se ha intentado unificarlas para facilitar la investigación traslacional y se ha formado un consorcio internacional que integra a los grupos más importantes que han compartido sus casos (4562 casos), sus análisis biológicos y sus clasificaciones previas (seis diferentes clasificaciones previas) generando una única clasificación, la del consenso de subtipos moleculares (consensus molecular subtypes –CMSs-):

- CMS1 (14% de los CCR): se denomina tipo inmune. Se asocia a MSI y a una importante activación inmunológica. Es el grupo que responde a inmunomoduladores (check point inhibitors). Se asocia a hipermutación, hipermetilación y a mutaciones en BRAF. Se asocia a mayor frecuencia de mujeres, ancianos y cólon derecho. En enfermedad resecable tienen mejor pronóstico pero en enfermedad avanzada se asocian a peor pronóstico
- CMS2 (37% de los CCR): tipo epitelial. Expresa activación de WNT y MYC. Tienen un número alto de alteraciones en el número de copia somáticas (somatic copy number alterations –SCNA-) y se asocia a mutaciones en p53. Se asocia a colon izquierdo.
- CMS3 (13% de los CCR): tipo metabólico. Tiene características epiteliales pero con importante disregulación metabólica. Tienen un número bajo de alteraciones en el número de copia somáticas (somatic copy number alterations –SCNA-). Se asocia a sobreexpresión de IGFBP2 y a mutaciones en KRAS.
- CMS4 (23% de los CCR): tipo mesenquimal. Presentan activación de TGFβ (transforming growth factor–), invasión estromal y angiogénesis. Más frecuente en jóvenes y estadios III y IV. Implican un peor pronóstico tanto en enfermedad resecada como en enfermedad avanzada.
- CMS no clasificables (13% de los CCR): presentan características intermedias y podrían deberse a fenotipos en transición o a heterogeneidad intratumoral

Esta clasificación del CCR es actualmente la más robusta desde el punto de vista biológico y debería ser la base para una futura clasificación clínica y para el desarrollo de tratamientos específicos para los distintos subtipos.

### Perfiles de expresión génica (categoría IIB) <sup>49,50</sup>

En la actualidad se hallan en desarrollo múltiples plataformas de análisis genómico con el fin de determinar el pronóstico de los pacientes con CCR precoz, especialmente en estadio II. Algunas de estas plataformas sólo utilizan material fresco, mientras que otras se basan en piezas conservadas en parafina. Estos estudios están todavía en una fase muy precoz, y deben ser validados en estudios prospectivos y comparados con los determinantes clásicos de riesgo de recidiva (recomendaciones de ASCO).

### Timidilato sintetasa (TS) (categoría IIB)

Es la principal diana del 5FU y cataliza la conversión de dUMP a dTMP, lo cual es un proceso clave en la síntesis de los nucleótidos.

#### Métodos de determinación

- Nivel de expresión (ARNm) por PCR.
- IHQ.
- Polimorfismos.

#### Utilidad clínica: valor pronóstico y valor predictivo

Varios estudios retrospectivos sugieren que los niveles altos de expresión de TS, determinados bien sea a nivel de ARNm o por IHQ, podrían tener un valor predictivo negativo de eficacia del tratamiento con fluoropirimidinas<sup>51,52</sup>.

También existen estudios que sugieren que distintos polimorfismos pueden influir sobre la eficacia de las fluoropirimidinas en estos pacientes<sup>53</sup>

- Polimorfismos VNTR (variable number of tandem repeats) en la región 5 UTR.
- Polimorfismos en 6 bp de la región 3 UTR.

El estudio fase III español SETICC ha evaluado de forma prospectiva la utilidad de adaptar el esquema de quimioterapia en primera línea según polimorfismos en TS y en ERCC1 y sus resultados están pendientes de publicación

#### *Recomendación*

*No se recomienda su uso fuera del contexto de un ensayo clínico.*

### Timidilato fosforilasa (TP) (categoría II B)

Cataliza la conversión de 5FU en FdUMP, el cual inhibe la TS (la diana del 5FU). También interviene en la conversión a nivel intratumoral de la capecitabina en 5FU.

#### Métodos de determinación

- Nivel de expresión (ARNm) por PCR.
- IHQ.
- ELISA.

### Utilidad clínica: valor pronóstico y valor predictivo

Varios estudios retrospectivos han encontrado que los niveles altos de expresión de TP, determinados bien sea a nivel de ARNm, por IHQ o por ELISA, tienen un valor predictivo positivo de eficacia del tratamiento con fluoropirimidinas. Otros estudios lo que sugieren es que es la relación entre la expresión de TP y la de TS lo que tiene valor predictivo<sup>54</sup>.

También existen estudios que sugieren que una mayor expresión de TP se correlaciona con mayor angiogénesis y progresión tumoral<sup>55,56</sup>.

Además la TP juega un papel fundamental en la conversión a nivel del tumor de la capecitabina en 5FU, por lo que dicha generación de 5FU (y por tanto la eficacia) se relacionaría directamente con el nivel de expresión intratumoral de TP y hay estudios retrospectivos que sugieren que una mayor expresión de TP por IHQ podría tener valor predictor de respuesta a la capecitabina en pacientes con CCR metastásico. La dependencia de la actividad de TP sería en teoría menor con otras fluoropirimidinas distintas de la capecitabina que no precisan de la TP para generar sus metabolitos activos. Sin embargo, estos hallazgos deberían ser adecuadamente validados antes de que la expresión de TP pudiese ser aceptada como un biomarcador que pudiese ayudar a escoger entre capecitabina u otras fluoropirimidinas para tratar a los pacientes.

#### *Recomendación*

*No se recomienda su uso fuera del contexto de un ensayo clínico.*

### EGFR (categoría IIB)

Las mutaciones en EGFR son muy raras y no tienen valor predictivo de eficacia en CCR<sup>57,58</sup>

La expresión proteica por IHQ de EGFR tampoco tiene valor predictivo de eficacia del tratamiento en CCR<sup>59,60</sup>[Chung et al. 2005; Cunningham et al. 2004].

En cambio, la amplificación de EGFR (FISH, SISH) sí se ha sugerido en algunos pequeños estudios retrospectivos que podría ser predictiva de una mayor eficacia de los monoclonales antiEGFR en CCRm<sup>58,61</sup>. No obstante, actualmente no es de utilidad clínica pues haría falta estandarizar la metodología y realizar estudios de validación adecuados.

### HER 2 (categoría IIB)

La sobreexpresión de HER2 (IHQ y/o amplificación) es poco frecuente en CCR (en torno al 11%)<sup>62</sup>.

Varios estudios han explorado su posible valor predictivo de eficacia de los monoclonales antiEGFR en CCR con resultados contradictorios. Algunos estudios han sugerido que la sobreexpresión de HER2 podría asociarse a una mayor eficacia de los antiEGFR<sup>63, 64</sup> y otros estudios no han confirmado este valor predictivo<sup>65,66</sup>.

En cuanto a la posible utilidad de los tratamiento anti-HER2 en pacientes con CCR y sobre-expresión de HER2 existen estudios preclínicos que sugieren que la combinación de antiHER2 y antiEGFR pueden ser un abordaje interesante<sup>67, 68</sup>.

No disponemos de ensayos clínicos que hayan explorado de forma adecuada el papel de los antiHER2 en CCR y tan solo disponemos de datos muy limitados de estudios fase II que por lento reclutamiento incluyeron un número insuficiente de pacientes pero que sugieren pudiese existir una interesante actividad<sup>69,70</sup>.

### Estado mutacional del gen BRaf como factor pronóstico y predictivo (categoría IIB)

El valor de las mutaciones de *BRaf* (V600E) como factor pronóstico o predictivo, se ha analizado en los pacientes con CCR tanto en la situación adyuvante como en la enfermedad avanzada<sup>71-73</sup>. La incidencia de mutaciones del gen *BRaf* en el CCR se sitúa en torno al 10%, siendo más frecuente en tumores con MSI. Estudios recientes indican valor pronóstico negativo de mutaciones de *B-raf* en los estadios II y III de CCR con MSI-L o MSS. Su valor como factor pronóstico negativo en la enfermedad avanzada también ha sido comprobado en diversos estudios.

Desde el punto de vista patogénico parecía interesante estudiar un posible valor predictivo negativo para eficacia de los antiEGFR en el tratamiento del CCRm de estas mutaciones que son excluyentes con respecto a las mutaciones en K-NRas. Todos los estudios coinciden en observar un claro valor pronóstico adverso de la presencia de dichas mutaciones en CCRm pero en cambio no está claro su valor predictivo de resistencia a monoclonales anti EGFR. Existen estudios que sugieren que los pacientes con estas mutaciones no se beneficiarían del tratamiento con antiEGFR como el estudio de Di Nicolantonio (no respuestas con cetuximab o panitumumab en monoterapia<sup>74</sup> 12), el fase III PICCOLO (efecto detrimental al añadir panitumumab a irinotecán en segunda línea<sup>75</sup>) o el fase III COIN (no beneficio de añadir cetuximab a combinaciones con oxaliplatino en primera línea<sup>76</sup>). Sin embargo cuando se realizó este análisis en otros estudios (PRIME y CRYSTAL), aunque el pronóstico era claramente peor en los pacientes con mutaciones en BRaf, sí parecía haber una discreta tendencia hacia mayor eficacia al añadir antiEGFR, aunque el escaso número de pacientes con BRaf mutado en estos estudios no permitía extraer conclusiones sólidas (PRIME<sup>10</sup>: 54 pacientes; SLP 6,1 vs 5,4 m, HR: 0,58, p=0,12; Sv 10,5 vs 9,2 m, HR 0,9, p 0,76; CRYSTAL<sup>77</sup>: 59 pts; SLP 8 vs 5,6 m, HR: 0,93, p=0,86; Sv 14,1 vs 10,3 m, HR 0,91, p 0,74).

### Otros posibles biomarcadores predictivos de eficacia de antiEGFR: (categoría IIB): EREG/AREG; PIK3CA, PTEN; (categoría III): Polimorfismos en FcγR, microRNAs, IGF1-R

Estudios retrospectivos y no randomizados sugieren que otros biomarcadores podrían ser predictores de menor eficacia con monoclonales anti-EGFR: mutaciones en el exón 20 de PIK3CA<sup>78</sup>, niveles bajos de expresión de ligandos (EREG/AREG)<sup>79,80</sup>, o pérdida de expresión de PTEN<sup>81</sup> y quizás también otros menos estudiados como ciertos Polimorfismos en Fc R<sup>82</sup>, ciertos microRNAs<sup>83</sup> o la sobreexpresión de IGF1-R<sup>84,85</sup>. Sin embargo ninguno de estos biomarcadores ha sido adecuadamente validado en estudios prospectivos y no son de utilidad a día de hoy en la clínica diaria, aunque su papel debería ser aclarado en el futuro en busca de una mejor selección de los pacientes que se van a beneficiar del tratamiento con anti-EGFR.

Con respecto a las mutaciones en PIK3CA, recientemente se ha sugerido por algunos estudios retrospectivos que podrían predecir en CCR eficacia del tratamiento con ácido acetil salicílico<sup>86,87</sup>, aunque en un pequeño estudio retrospectivo recientemente comunicado no se observó este efecto<sup>88</sup>.

En todo caso es una cuestión muy interesante que se está investigando prospectivamente en la actualidad y habrá que esperar a los resultados de estos estudios para poder sacar conclusiones.

### POCO ESTUDIADOS (Categoría III)

**Biomarcadores que intervienen en la reparación de los daños en el ADN producidos por los platinos (ERCC1, XRCC1, ERCC2, XRCC3, GADD45A) o que evitan que se produzcan dichos daños (GST) (Categoría III)**

El efecto antitumoral de los platinos (incluido el oxaliplatino) viene mediado por daños en el ADN que inducen a la apoptosis de la célula tumoral.

Varias enzimas, que intervienen en la reparación de estos daños en el ADN, parecen jugar un papel importante en la resistencia a los platinos:

- ERCC1 (excision repair cross complementing 1).
- XRCC1 (X-ray cross complementing group 1).
- ERCC2 (también conocido como XPD –xeroderma pigmentosum group D–).
- XRCC3 (X-ray cross complementing group 3).
- GADD45A. Interviene también en el control del ciclo celular.

También parecen jugar un papel en la resistencia a los platinos las GST (glutación S-transferasas), que es una familia de isoenzimas entre las que destacan GSTP1, GSTT1 y GSTM1. Estas enzimas neutralizan el platino a nivel del citoplasma, evitando su interacción con el ADN.

### Métodos de determinación

- Nivel de expresión ARNm (PCR).
- Nivel de expresión de proteína (ELISA o IHQ).
- Polimorfismos.

### Utilidad clínica: valor pronóstico y valor predictivo

En diversos estudios retrospectivos se ha sugerido que una mayor expresión de estos genes, un mayor nivel de su proteína o ciertos polimorfismos se asocian con una menor eficacia del tratamiento con platinos, siendo el más estudiado en CCR el ERCC1<sup>89,90</sup>. Son necesarios estudios prospectivos aleatorizados que validen esta posible utilidad como biomarcadores en CCR. Con respecto a los polimorfismos de ERCC-1, el estudio fase III español SETICC ha evaluado de forma prospectiva la utilidad de adaptar el esquema de quimioterapia en primera línea según polimorfismos en TS y en ERCC1 y sus resultados están pendientes de publicación.

#### *Recomendación*

*No se recomienda su uso fuera del contexto de un ensayo clínico.*

## NO UTILES (Categoría IV)

### Marcadores de angiogénesis (categoría IV)

Se ha determinado mediante el análisis de densidad microvascular (MVD) en el tumor o mediante la medición de moléculas promotoras de angiogénesis. La MVD se determina mediante el análisis de marcadores de células endoteliales con anticuerpos específicos, dirigidos a CD34, CD31, o el factor anti-VIII. Existe una correlación inversa entre la expresión por IHC de la MVD y la supervivencia cuando la MVD se determinó utilizando anticuerpos dirigidos contra CD31 o CD34, pero no contra el factor VIII. Es necesario el estudio de la MVD como factor pronóstico en ensayos clínicos prospectivos. Además, se carece de guías de consenso acerca de la mejor forma de cuantificar, evaluar e interpretar la MVD. En la actualidad, debido a la falta de estudios prospectivos, no se puede proponer a la MVD como marcador pronóstico. Con respecto a las moléculas promotoras de angiogénesis, la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se ha medido con el análisis de ARNm o mediante IHC con anticuerpos anti- VEGF. No se dispone de estudios que aclaren el papel de VEGF o de otras moléculas relacionadas con la angiogénesis como factores pronóstico en el CCR.

### Marcadores de metástasis e invasión (categoría IV) <sup>91,92</sup>

Se han determinado el valor de moléculas efectoras críticas en el proceso de invasión y metástasis, tales como los factores de crecimiento relacionados con el plasminógeno, así como las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Los factores de crecimiento, relacionados con el plasminógeno (uPA, uPAR, tPA, PLG, PAI-1 y PAI-2), se han determinado con ensayos inmunosorbentes ligados a la enzima (ELISA), o por IHC tanto en el tumor así como en factores solubles en el suero de algunos de ellos. Los estudios retrospectivos muestran resultados no contradictorios, pero todos procedentes de la literatura antigua; no se puede proponer como marcador en la actualidad. De las 15 diferentes MMPs, 3 se han estudiado en el CCR para establecer su valor pronóstico. La expresión de MMPs se ha determinado por diferentes técnicas, como IHC y ARNm, tanto en el tumor como en los niveles séricos. Los estudios retrospectivos muestran resultados contradictorios, y no se puede proponer como marcador en la actualidad.

### Índice de proliferación (categoría IV) <sup>93-96</sup>

El índice de proliferación puede medirse mediante diferentes técnicas: índice mitótico, análisis del porcentaje de células en fase S mediante citometría de flujo, determinación por inmunohistoquímica (IHC) de los marcadores de proliferación celular, como el antígeno nuclear Ki-67 o el antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA). Las dos formas más frecuentes de determinar el índice de proliferación son mediante citometría de flujo (porcentaje de células en fase S) y por IHC.

Es controvertida la relación entre el porcentaje de células en fase S, medido mediante citometría de flujo, y el pronóstico de los pacientes con CCR localizado. Algunos estudios sugieren que un mayor porcentaje de células en fase S es un factor pronóstico independiente, mientras que otros estudios no encuentran esta asociación. Debido a estos resultados con-

tradictorios, no se aconseja el uso del porcentaje de células en fase S como factor pronóstico independiente en los pacientes con CCR precoz (estadios II y III). El PCNA es una alternativa atractiva al análisis del porcentaje de células en fase S medido mediante citometría de flujo. En un estudio, que analizaba el índice de PCNA en las células tumorales localizadas en el margen tumoral, se encontró una relación lineal entre dicho índice, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG). Sin embargo, otros estudios han fracasado en demostrar que PCNA es un factor pronóstico independiente. El PCNA también puede determinarse mediante IHQ. Existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos cuando se utiliza el anticuerpo monoclonal anti-PCNA PC10 en la medición del PCNA. También es posible, mediante IHQ, determinar el índice de proliferación celular con el antígeno nuclear Ki-67 (y su epítipo MIB-1). Son necesarios estudios prospectivos que evalúen el papel del PCNA y del antígeno nuclear Ki-67 como marcadores moleculares pronósticos tras la resección de CCR en estadios II y III.

### Gen supresor tumoral P53 (categoría IV) <sup>97</sup>

Se han utilizado dos técnicas completamente diferentes para medir el valor de este posible marcador, con resultados muy divergentes: el análisis de ADN para detectar diferentes mutaciones en el gen p53, y la acumulación anormal de la proteína p53 mediante técnicas de IHC. Este último tipo de análisis se ha hecho asumiendo que las alteraciones en el gen p53 producirían proteína p53 anómala que se reaccumularía en la célula, aunque esta afirmación puede no ser correcta, ya que algunos cambios genéticos de p53 no se traducen en la sobreexpresión de p53, y al revés, la expresión positiva de p53 puede ocurrir en ausencia de mutaciones de p53. Se calcula que la correlación entre las dos técnicas en el CCR es del 70%. Los resultados de varios metaanálisis sugieren que la determinación de la anormalidad de p53 por IHC o la secuenciación de ADN tiene un impacto adverso, aunque muy modesto. Sin embargo, el hecho de que se trate de estudios retrospectivos, utilizando técnicas diferentes y no estandarizadas, hace que no se pueda proponer como marcador en la actualidad para el tratamiento adyuvante.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, *et al.* Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28: 466-74.
2. Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, *et al.* KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7322-9.
- 3.- Amado RG, Wolf M, Peeters M, *et al.* Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Apr 1;26(10):1626-34
- 4.- Douillard JY, Siena S, Cassidy J, *et al.* Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 1;28(31):4697-705

- 5.- Peeters M, Price TJ, Cervantes A, et al. Final results from a randomized phase 3 study of FOLFIRI {+/-} panitumumab for second-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014 Jan;25(1):107-16
- 6.- Seymour MT, Brown SR, Richman S, et al. Addition of panitumumab to irinotecan: Results of PICCOLO, a randomized controlled trial in advanced colorectal cancer (aCRC). *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 3523)
- 7.- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1757-65
- 8.- Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Apr 2;360(14):1408-17
- 9.- Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol*. 2011 Jul;22(7):1535-46
- 10.- Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013 Sep 12;369 (11):1023-34
- 11.- Patterson SD, Peeters M, Siena S, et al. Comprehensive analysis of KRAS and NRAS mutations as predictive biomarkers for single agent panitumumab (pmab) response in a randomized, phase III metastatic colorectal cancer (mCRC) study (20020408). *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3617)
- 12.- Peeters M, Oliner KS, Price TJ, et al. Analysis of KRAS/NRAS mutations in phase 3 study 20050181 of panitumumab (pmab) plus FOLFIRI versus FOLFIRI for second-line treatment (tx) of metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 3; abstr LBA387)
- 13.- Tejpar S, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Effect of KRAS and NRAS mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus FOLFOX4: New results from the OPUS study. *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 3; abstr LBA444)
- 14.- Ciardiello F, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Effect of KRAS and NRAS mutational status on first-line treatment with FOLFIRI plus cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): New results from the CRYSTAL trial. *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 3; abstr LBA443)
- 15.- Rivera F, Karthaus M, Fasola G, et al. "KRAS/NRAS mutations in PEAK: a randomized phase 2 study of 1st-line treatment with FOLFOX6+panitumumab or bevacizumab for wild-type KRAS mCRC". *ESMO 15th World Congress on Gastrointestinal Cancer*. Barcelona, Julio 2013.
- 16.- Stintzing S, Jung A, Rossius L, et al. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in FIRE-3: A randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. *European Cancer Congress 2013; Abstract LBA17*.

- 17.- HJ Lenz, D Niedzwiecki, F Innocenti, et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of FOLFIRI or mFOLFOX6 with bevacizumab or cetuximab for patients with expanded RAS analyses in untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum. ESMO Meeting 2014. Abstract 501O
- 18.- Yen LC, Yeh YS, Chen CW, et al. Detection of KRAS oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1;15(13):4508-13
- 19.- Morgan SR, Whiteley J, Donald E, et al. Comparison of KRAS Mutation Assessment in Tumor DNA and Circulating Free DNA in Plasma and Serum Samples. *Clin Med Insights Pathol*. 2012;5:15-22.
- 20.- Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012 Jun 28; 486 (7404): 532-6.
- 21.- Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):537-40.
- 22.- Chen D, Huang J-F, Liu K, Zhang L-Q, Yang Z, Chuai Z-R, et al. (2014) BRAFV600E Mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9(3): e90607. doi:10.1371/journal.pone.0090607
- 23.- Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):466-74.
- 24.- Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2015 Mar;51(5):587-94.
- 25.- Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Sorich MJ (2015) Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 112: 1888–1894.
- 26.- Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol*. 2015 Oct;16(13):1306-15
- 27.- Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979.
- 28.- Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609-17.
- 29.- Walter A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 2008; 57: 941-50.

- 30.- Des Guetz G, Nicolas P, Perret Gy, Morere JF, Uzzan B. Does delaying adjuvant chemotherapy after curative surgery for colorectal cancer impair survival? A meta-analysis. *Eur J Cancer* 2010; 46: 1049-55.
- 31.- Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of Fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3219-26.
- 32.- Dung T. Le, M.D., Jennifer N. Uram, Ph.D., Hao Wang, Ph.D., Bjarne R. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372:2509-2520
- 33.- Jen J, Kim H, Piantadosi S, *et al.* Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 213.
- 34.- Shibata D, Reale MA, Lavin P, *et al.* The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; 335: 1727.
- 35.- Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renée N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer* 1999; 79: 627-30.
- 36.- Ezzeldin H, Diasio R. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, a pharmacogenetic syndrome associated with potentially life-threatening toxicity following 5-fluorouracil administration. *Clin Colorectal Cancer* 2004 Sep; 4 (3): 181-9.
- 37.- Saif MW, Ezzeldin H, Vance K, Sellers S, Diasio RB. DPyD\*2A mutation: the most common mutation associated with DPD deficiency. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007 Sep; 60 (4): 503-7. Epub 2006 Dec 13.
- 38.- Ezzeldin HH, Lee AM, Mattison LK, Diasio RB. Methylation of the DPyD promoter: an alternative mechanism for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005 Dec 15; 11 (24 Pt 1): 8699-705.
- 39.- Mattison LK, Fourie J, Hirao y, Koga T, Desmond RA, King JR, Shimizu T, Diasio RB. The uracil breath test in the assessment of dihydropyrimidine dehydrogenase activity: pharmacokinetic relationship between expired <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> and plasma [2-<sup>13</sup>C] dihydrouracil. *Clin Cancer Res* 2006 Jan 15; 12 (2): 549-55.
- 40.- Vallböhmer D, yang Dy, Kuramochi H, *et al.* DPD is a molecular determinant of capecitabine efficacy in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2007; 31: 413-8.
- 41.- Harouaka R1, Kang Z2, Zheng SY, *et al.* Circulating tumor cells: Advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther.* 2014 Feb;141(2):209-21.
- 42.- Peach G, Kim C, Zacharakis E, *et al.* Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: a systematic review. *Br J Cancer* 2010 Apr 27; 102 (9): 1327-34.
- 43.- Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A, *et al.* Circulating Tumor Cell Count Is a Prognostic Factor in Metastatic Colorectal Cancer Patients Receiving First-Line Chemotherapy Plus Bevacizumab: A Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors Study. *Oncologist.* 2012;17(7):947-55

- 44.- Côté JF, Kirzin S, Kramar A, Mosnier JF, Diebold MD, Soubeyran I, Thirouard AS, Selves J, Laurent-Puig P, ychou M. UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. *Clin Cancer Res* 2007 Jun 1; 13 (11): 3269-75.
- 45.- Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1382-8.
- 46.- Marcuello E, Altés A, Menoyo A, et al. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 678-82.
- 47.- Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1290-5.
- 48.- Justin Guinney, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine* 21, 1350–1356 (2015)
- 49.- Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A, et al: Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: Results and perspectives. *Cancer Treatment Reviews* 35:201-209, 2009
- 50.- Salazar R, Roepman P, Capella G, et al: Gene Expression Signature to Improve Prognosis Prediction of Stage II and III Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 29:17-24, 2011
- 51.- Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 529-36.
- 52.- Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, *et al.* Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2008; 19: 915-19.
- 53.- Kawakami K. Watanabe G: identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003; 63: 6004-7.
- 54.- Kumamoto K, Kuwabara K, Tajima Y, et al. Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase mRNA expression in primary lesions using laser capture microdissection is useful for prediction of the efficacy of FOLFOX treatment in colorectal cancer patients with liver metastasis. *Oncol Lett.* 2012 May;3(5):983-989
- 55.- Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, et al. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* 1995; 55: 1687-90.
- 56.- Mitselou A, Ioachim E, Skoufi U, et al. Predictive role of thymidine phosphorylase expression in patients with colorectal cancer and its association with angiogenesis-related proteins and extracellular matrix components. *In Vivo.* 2012 Nov-Dec;26(6):1057-67.

- 57.- Barber, T., Vogelstein, B., Kinzler, K. and Velculescu, V. Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *N Engl J Med*, 2004, 351: 2883.
- 58.- Moroni, M., Veronese, S., Benvenuti, S., et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*, 2005, 6: 279-286.
- 59.- Chung, K., Shia, J., Kemeny, N., et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 1803-1810.
- 60.- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, 351: 337-345.
- 61- Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G., et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 5924-5930.
- 62.- Kavanagh, D., Chambers, G., O'Grady, et al. Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer? *BMC Cancer*, 2009, 9: 1.
- 63.- Barbara, C., Martin, V., Molinari, F., et al. Use of HER2 gene amplification to identify patients with metastatic colorectal cancer resistant to anti-EGFR monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2012, 30(Suppl. 4): abstract 474.
- 64.- Finocchiaro, G., Cappuzzo, F., Jänne, et al. EGFR, HER2 and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007, 25: 4021.
- 65.- Tol, J., Dijkstra, J., Klomp, M., et al Markers for EGFR pathway activation as predictor of outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with or without cetuximab. *Eur J Cancer*, 2010, 46: 1997-2009.
- 66.- Troiani, T., Zappavigna, S., Martinelli, et al. Optimizing treatment of metastatic colorectal cancer patients with anti-EGFR antibodies: overcoming the mechanisms of cancer cell resistance. *Expert Opin Biol Ther* 2013, 13: 241-255.
- 67- Bertotti, A., Migliardi, G., Galimi, et al. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ('xenopatients') identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* 2011, 1: 508-523.
- 68.- Pohl, M., Stricker, I., Schoeneck, A., et al. Antitumor activity of the HER2 dimerization inhibitor pertuzumab on human colon cancer cells in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* , 2009, 135: 1377-1386.
- 69.- Clark, J., Niedzwiecki, D., Hollis, D. and Mayer, R. Phase II trial of 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin (LV), oxaliplatin (Ox), and trastuzumab (T) for patients with metastatic colorectal cancer (CRC) refractory to initial therapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003, 22: abstract 3584.
- 70.- Ramanathan, R., Hwang, J., Zamboni, W., et al. Low overexpression of HER-2/neu in advanced colorectal cancer limits the usefulness of trastuzumab (Herceptin) and irinotecan as therapy. A phase II trial. *Cancer Invest* , 2004, 22: 858-865.

- 71.- Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, *et al.* Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28: 466-74.
- 72.- Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, *et al.* CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009; 58: 90-6.
- 73.- Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, *et al.* Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite- stable colon cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 6063-9.
- 74.- Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, *et al.* Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5705-12.
- 75.- Seymour MT, Brown SR, Richman S, *et al.* Addition of panitumumab to irinotecan: Results of PICCOLO, a randomized controlled trial in advanced colorectal cancer (aCRC). *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 3523)
- 76.- Maughan TS, Adams RA, Smith CG, *et al.* Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet.* 2011
- 77.- Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, *et al.* Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):2011-9.
- 78.- Mao C, Yang ZY, Hu XF, *et al.* PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2012 Jun;23(6):1518-25.
- 79.- D. J. Jonker, C. Karapetis, C. Harbison, *et al.* High epiregulin (EREG) gene expression plus K-ras wild-type (WT) status as predictors of cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer (ACRC): Results from NCIC CTG CO.17—A phase III trial of cetuximab versus best supportive care (BSC). *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 4016)
- 80.- Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, *et al.* Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2009 Oct 20;27(30):5068-74.
- 81.- Wang ZH, Gao QY, Fang JY. Loss of PTEN expression as a predictor of resistance to anti-EGFR monoclonal therapy in metastatic colorectal cancer: evidence from retrospective studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Jun;69(6):1647-55.
- 82.- Rodríguez J, Zarate R, Bandres E, *et al.* Fc gamma receptor polymorphisms as predictive markers of Cetuximab efficacy in epidermal growth factor receptor downstream-mutated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2012 Aug;48(12):1774-80.
- 83.- Zarate R, Boni V, Bandres E, Garcia-Foncillas J. MiRNAs and LincRNAs: Could They Be Considered as Biomarkers in Colorectal Cancer?. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(1): 840-65.
- 84.- Hu, Y., Patil, S., Panasiewicz, M., Li, W., *et al.* Heterogeneity of receptor function in colon carcinoma cells determined by cross-talk between type I insulin-like growth factor receptor and epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* , 2008, 68: 8004-8013.

- 85.- Scartozzi, M., Mandolesi, A., Giampieri, R., et al. Insulin-like growth factor 1 expression correlates with clinical outcome in K-RAS wild type colorectal cancer patients treated with cetuximab and irinotecan. *Int J Cancer* , 2010, 127: 1941-1947.
- 86.- Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med*. 2012
- 87.- Domingo E, Church DN, Sieber O, et al. Evaluation of PIK3CA mutation as a predictor of benefit from nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Dec 1;31(34):4297-305
- 88.- Kothari N, Kim RD, Gibbs P, et al. Regular aspirin (ASA) use and survival in patients with PIK3CA-mutated metastatic colorectal cancer (CRC). *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 3; abstr 386)
- 89.- Lenz HJ, Zhang W, Shi MM, et al. ERCC-1 gene expression levels and outcome to FOLFOX chemotherapy in patients enrolled in CONFIRM1 and CONFIRM2. *J Clin Oncol* 2008; 26: (abstract 4131).
- 90.- Bohanes P, Labonte MJ, Lenz HJ. A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2011 Sep;10(3):157-64.
- 91.- Neoptolemos JP, Oates GD, Newbold KM, et al. Cyclin/proliferation cell nuclear antigen immunohistochemistry does not improve the prognostic power of Dukes or Jass classifications for colorectal cancer. *Br J Surg* 1995; 82: 184-7.
- 92.- Holt PR, Moss SF, Kapetanakis AM, et al. Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 131-5.
- 93.- Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, et al. DNA ploidy and S-phase fraction, but not p53 or NM23-H1 expression, predict outcome in colorectal cancer patients. Result of a 5-year prospective study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 650-8.
- 94.- Salud A, Porcel JM, Raikundalia B, et al. Prognostic significance of DNA ploidy, S-phase fraction, and Pglycoprotein expression in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1999; 72: 167-74.
- 95.- Chen HS, Sheen-Chen SM, Lu CC. DNA index and S-phase fraction in curative resection of colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. *World J Surg* 2002; 26: 626-30.
- 96.- Geido E, Sciotto A, Rubagotti A, et al. Combined DNA flow cytometry and sorting with k-ras2 mutation spectrum analysis and the prognosis of human sporadic colorectal cancer. *Cytometry* 2002; 50: 216-24.
- 97.- Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 2005; 92: 434.