

UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO

FACULTAD DE MEDICINA

**Programa de doctorado en Investigación clínica y
traslacional en enfermedades de alta prevalencia**



UAX

**Universidad
Alfonso X el Sabio**

**ANÁLISIS COMPARATIVO ANATOMO-CLÍNICO Y
MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL SEGÚN LA EDAD
DE APARICIÓN Y LA LOCALIZACIÓN TUMORAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

LORENA BRANDARIZ GIL

Director: doctor José Perea García
Tutor: doctor Francisco Manuel Bujalance Cabrera

Villanueva de la Cañada, 2025



UAX

**Universidad
Alfonso X el Sabio**

UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO

FACULTAD DE MEDICINA

**Programa de doctorado en Investigación clínica y traslacional en
enfermedades de alta prevalencia**

**ANÁLISIS COMPARATIVO ANATOMO-CLÍNICO Y
MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL SEGÚN LA EDAD
DE APARICIÓN Y LA LOCALIZACIÓN TUMORAL**

TESIS DOCTORAL

LORENA BRANDARIZ GIL

Villanueva de la Cañada, 2025

A mi padre.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. José Perea, por su guía en la confección de este trabajo, por su espíritu contagioso por la investigación, por haberme tendido una mano en los momentos difíciles y por ser más que un jefe, un amigo.
- Al servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre (Dra. Yolanda Rodríguez), por su colaboración en el estudio histológico de las muestras.
- A los servicios de Biología Molecular del Hospital 12 de Octubre (Dr. Daniel Rueda), al servicio de Biología Molecular del Hospital Universitario de Salamanca (Dr. Rogelio González) y al Departamento de Genética Molecular en Oncohematología del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (Dr. Juan Luis García), por llevar a cabo el estudio genético del presente trabajo.
- A Pedro y a mis hijos, los pilares de mi vida, la motivación para todo lo que hago. No podría haber elegido un mejor compañero de vida, su paciencia, apoyo y complicidad son la esencia de este trabajo y la familia que hemos formado es mi mayor orgullo.
- A mi madre y a mis hermanos, por ser el sostén a lo largo de todos los años de estudio y el refugio en los malos momentos. Son mi hogar, de todas las formas posibles.
- A mi padre, mi ejemplo en lo personal y en lo profesional, el espejo en el que me miro cada día y la mano que me guía en todo momento, aunque no le vea.
- A todos los pacientes y familiares que dieron el consentimiento para la recogida de muestras y datos, por facilitar este trabajo. Y, por último, a todos los pacientes que han escuchado alguna vez la palabra cáncer, para que la ciencia nos permita dar esperanza en los malos momentos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	IX
RELACIÓN DE TABLAS.....	XIV
RELACIÓN DE FIGURAS.....	XVIII
RESUMEN.....	XXI
ABSTRACT.....	XXV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Epidemiología.....	1
1.1. Incidencia del CCR en el adulto joven.....	2
1.2. Incidencia del CCR de aparición tardía.....	5
2. Bases moleculares del CCR.....	5
2.1. Secuencia adenoma-carcinoma.....	6
2.2. Vías principales de carcinogénesis.....	7
2.2.1. Inestabilidad cromosómica (IC).....	7
2.2.2. Inestabilidad de microsatélites (IMS).....	10
2.2.3. Vía serrada o fenotipo metilador.....	13
2.3. Características moleculares del CCR en jóvenes y comparativo con el CCR de aparición tardía.....	16
3. Factores de riesgo.....	18
3.1. Factores de riesgo modificables y no modificables.....	18
3.2. Microbioma.....	20
4. Fisiopatología.....	21
5. Diagnóstico del CCR. <i>Screening</i> y sistemas de detección precoz.....	23
5.1. Clínica.....	23
5.2. Estudios de laboratorio.....	24

5.3. Estudios endoscópicos.....	25
5.4. Estudios de imagen.....	27
5.5. <i>Screening</i> en el CCR.....	29
5.5.1. Métodos de <i>screening</i>	30
5.5.2. Población de <i>screening</i>	31
6. Estadificación del CCR. Clasificación TNM.....	36
7. Tratamiento y seguimiento del CCR.....	38
7.1. Tratamiento endoscópico.....	38
7.2. Cirugía.....	43
7.2.1. Estudio preoperatorio y estadificación tumoral.....	43
7.2.2. Técnica quirúrgica.....	44
7.2.3. Tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto.....	46
7.2.4. Calidad de la cirugía.....	48
7.2.5. Manejo postoperatorio.....	48
7.3. Tratamiento sistémico de la enfermedad primaria.....	48
7.4. Tratamiento de la enfermedad metastásica.....	50
7.5. Seguimiento.....	51
8. CCR familiar: síndrome de Lynch, poliposis adenomatosa familiar y otros síndromes hereditarios.....	52
8.1. Síndrome de Lynch (SL).....	52
8.2. Poliposis adenomatosa familiar (PAF).....	55
8.3. Síndromes de poliposis hamartomatosa.....	56
9. Características del CCR según su localización en el colon.....	57
10. Características del CCRJ.....	60
 II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	 68
1. Justificación.....	68
2. Hipótesis.....	69

3. Objetivos.....	69
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	74
1. Población de estudio.....	74
1.1. Criterios de inclusión y exclusión.....	74
1.2. Variables recogidas.....	74
1.2.1. Variables clínicas.....	74
1.2.2. Variables anatomopatológicas.....	74
1.2.3. Variables de evolución de la enfermedad.....	75
1.2.4. Información familiar.....	75
2. Muestras.....	76
2.1. Tejido tumoral.....	76
2.2. Sangre periférica.....	77
2.3 Valoración de la cantidad y calidad del ADN obtenido.....	77
3. Estudio de la inestabilidad de microsatélites.....	77
3.1. Panel de Bethesda.....	77
3.2. Estudio molecular de los genes MMR (<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> Y <i>MSH6</i>).....	79
3.2.1. Estudio de mutaciones en los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	79
3.2.2. Análisis de grandes deleciones genómicas en <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	82
3.2.3. Estudio de mutaciones en el gen <i>MSH6</i>	84
3.2.4. Estudio de la hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i>	87
3.3. Estudio inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de errores de ADN (<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i>).....	89
4. Estudio de la inestabilidad cromosómica mediante arrays de CGH (<i>Comparative Genomic Hybridisation</i>).....	90
5. Estudio del fenotipo metilador de islotes CpG (CIMP).....	92
6. Estudio del estado mutacional de <i>BRAF</i>	93
7. Estudio de variantes somáticas mediante NGS (Next Generation Sequencing).....	94

8. Análisis estadístico.....	100
IV. RESULTADOS.....	105
1. Resultados en pacientes con CCR de aparición tardía.....	105
1.1. Resultados globales del grupo de CCRAT.....	105
1.1.1. Características clínicas y de seguimiento.....	105
1.1.2. Características familiares.....	106
1.1.3. Características anatomopatológicas.....	107
1.1.4. Características moleculares.....	108
1.2. Análisis del CCRAT, según su localización tumoral.....	110
1.2.2. Características familiares.....	112
1.2.3. Características anatomopatológicas.....	112
1.2.4. Características moleculares.....	114
1.2.4.1. Vía de la inestabilidad de microsatélites y estado mutacional de <i>BRAF</i>	114
1.2.4.2. Fenotipo metilador.....	115
1.2.4.3. Vía de la inestabilidad cromosómica.....	115
2. Resumen de resultados en pacientes con CCR jóvenes.....	118
3. Análisis comparativo de los resultados en CCR de aparición tardía y jóvenes, según su localización en el colon.....	121
3.1. Características clínicas y de seguimiento.....	121
3.2. Características familiares.....	124
3.3. Características anatomopatológicas.....	126
3.4. Características moleculares.....	128
3.4.1. Vía de la inestabilidad de microsatélites y estado mutacional de <i>BRAF</i>	128
3.4.2. Fenotipo metilador.....	129
3.4.4. Vía de la inestabilidad cromosómica.....	131

3.5. Estudio de variantes somáticas en ambos grupos de edad mediante NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>).....	138
4. Resumen de los resultados según la localización tumoral.....	141
V. DISCUSIÓN.....	146
1. Pacientes con CCR de aparición tardía.....	147
1.1. Características globales del CCRAT.....	147
1.2. Características del CCRAT, según su localización tumoral.....	149
1.2.1. Características clínicas, familiares y anatomopatológicas del CCRAT, según su localización tumoral.....	149
1.2.2. Características moleculares del CCRAT, según su localización tumoral.....	153
2. Pacientes con CCR jóvenes.....	156
3. Análisis comparativo del CCR según la edad de aparición y la localización tumoral.....	157
3.1. Tumores de localización derecha: análisis comparativo entre el CCRJ y el CCRAT.....	157
3.2. Tumores de localización izquierda: análisis comparativo entre el CCRJ y el CCRAT.....	159
3.3. Tumores de localización rectal: análisis comparativo entre el CCRJ y el CCRAT...	161
VI. CONCLUSIONES.....	167
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	170
VIII. ANEXOS.....	184
Anexo 1. Consentimiento informado para la recogida de muestras.....	184
Anexo 2. Proceso bioquímico detallado para el análisis molecular de las muestras de ADN.....	190

1. Proceso de tinción con hematoxilina-eosina y proceso de extracción de ADN de las muestras de tejido tumoral.....	190
1.1. Proceso de tinción con hematoxilina-eosina.....	190
1.2. Proceso de extracción de ADN.....	190
2. Proceso de extracción de ADN genómico de las muestras de sangre periférica.....	191
2.1. Extracción manual.....	191
2.2. Extracción automática.....	191
3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2% para valoración de la cantidad y calidad del ADN obtenido.....	192
4. Ensayo de PCR multiplex para el análisis de los microsatélites.....	193
5. Estudio molecular de los genes MMR (<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> Y <i>MSH6</i>).....	194
5.1. Componentes y condiciones para el estudio de las mutaciones en los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	194
5.2. Protocolo para el análisis de grandes deleciones genómicas en <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> ...	194
5.3. Estudio de mutaciones en el gen <i>MSH6</i>	196
5.4. Estudio de la hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i>	197
5.4.1. Protocolo para la modificación con bisulfito sódico.....	197
5.4.2. Protocolo para la realización de las PCR específicas de presencia o ausencia de metilación.....	197
5.4.3. Protocolo para la realización de las PCR no específicas del estado de metilación.....	198
6. Proceso para el estudio inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de errores de ADN (<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i>).....	199
7. Procedimiento para la hibridación dentro del estudio de la inestabilidad cromosómica mediante arrays de CGH (<i>Comparative Genomic Hybridisation</i>).....	199
8. Protocolo para el estudio del estado mutacional de <i>BRAF</i>	200
9. Protocolo para el estudio de variantes somáticas mediante NGS.....	200

Anexo 3. Differential clinicopathological and molecular features within late-onset colorectal cancer according to tumor location.....	204
Anexo 4. Clinical and molecular comparative study of colorectal cancer based on age-of-onset and tumor location: two main criteria for subclassifying colorectal cancer.....	207
Tabla complementaria 1. Regiones cromosómicas recurrentemente alteradas según su localización tumoral en el CCRAT.....	211
Tabla complementaria 2. Regiones cromosómicas recurrentemente alteradas según su localización tumoral en el CCRJ.....	212

ABREVIATURAS

- **A:** Adenina.
- **AAS:** Ácido acetilsalicílico.
- **Abs:** Absorbancia.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AJCC:** *American joint committee on cancer*; comisión conjunta estadounidense para el cáncer.
- **ANC:** Alteración en el número de copias.
- **ANCS:** Alteración en el número de copias somáticas.
- **ANOVA:** *Analysis of variance*; análisis de varianza.
- **APC:** *Adenomatous polyposis coli*; gen causal de la poliposis adenomatosa familiar.
- **Arg:** Arginina.
- **Asp:** Ácido aspártico.
- **BAC:** *Bacterial artificial chromosome*; cromosoma artificial bacteriano.
- **BAT:** *Big adenina tracto*; secuencia mononucleotídica del panel Bethesda.
- **Bp:** *Base pairs*; pares de bases.
- **C:** Citosina.
- **c:** Codón.
- **CBS:** *Circular binary segmentation*; algoritmo matemático que permite ubicar alteraciones en la dosis génica.
- **CCR:** Cáncer colorrectal.
- **CCRAT:** Cáncer colorrectal de aparición tardía.
- **CCRD:** Cáncer colorrectal derecho.
- **CCRI:** Cáncer colorrectal izquierdo.
- **CCRJ:** Cáncer colorrectal en jóvenes.
- **CEA:** Antígeno carcinoembrionario.
- **CGH:** *Comparative genomic hybridization*; hibridación genómica comparada.
- **CIMP:** *CpG island methylator phenotype*; fenotipo metilador de islas de CpG.
- **Cm:** Centímetros.
- **COBRA:** *Combined bisulfite restriction analysis*; análisis de restricción combinado con bisulfito.
- **COX-2:** Ciclooxygenasa 2.
- **CpG:** Fenotipo metilador de islas de citosina/guanina.

- **CU:** Colitis ulcerosa.
- **DE:** Desviación estándar.
- **Del:** Deleción.
- **dHPLC:** *Denaturing high-performance liquid chromatography*; cromatografía líquida de alto rendimiento con gradiente desnaturalizante.
- **DM2:** Diabetes mellitus tipo 2.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- **dNTP:** *Deoxynucleotide triphosphate*; desoxinucleótido trifosfato.
- **E:** Ácido glutámico.
- **EDTA:** *Ethylenedinitrilotetraacetic acid*; ácido etilendiaminotetraacético.
- **EGFR:** *Epidermic growing factor receptor*; receptor de factor de crecimiento epidérmico.
- **EII:** Enfermedad inflamatoria intestinal.
- **EMS:** Estabilidad de microsatélites.
- **eQTL:** *Expression quantitative trait loci*; loci genómico que contribuye a la variación de los niveles de expresión.
- **ERAS:** *Enhanced recovery after surgery*; recuperación precoz tras la cirugía.
- **ETM:** Excisión total del mesorrecto.
- **FDR:** *False discovery rate*; tasa de falso descubrimiento.
- **FISH:** *Fluorescent in situ hybridization*; hibridación fluorescente in situ.
- **fs:** *Frameshift*; mutación con desplazamiento del marco de lectura.
- **G:** Guanina.
- **Gln:** Glutamina.
- **Glu:** Ácido glutámico.
- **GNL:** *Gain, normal, los*; ganancia, normal, pérdida.
- **GWAS:** *Genome-wide association study*; estudio de asociación del genoma completo.
- **H:** Histidina.
- **HGVS:** *Human genome variation society*; sociedad de Variaciones del Genoma Humano.
- **His:** Histidina.
- **HRM:** *High resolution melting*; análisis de alta resolución de fusión.
- **I:** Isoleucina.
- **IC:** Inestabilidad cromosómica.
- **IC:** Intervalo de confianza.
- **IHQ:** Inmunohistoquímica.

- **IIG:** Índice de inestabilidad genómica.
- **Ile:** Isoleucina.
- **IMC:** Índice de masa corporal.
- **IMS:** Inestabilidad de microsatélites.
- **L:** Leucina.
- **LARS:** *Low anterior resection syndrome*; síndrome de resección anterior baja.
- **Leu:** Leucina.
- **LOH:** Loss of heterocigosity; pérdida de heterocigosidad.
- **LV:** Leucovorin.
- **M:** Molar.
- **Mb:** Megabase.
- **MCR:** *Minimal common regions*; regiones mínimas comunes.
- **MeV:** *Multiexperiment viewer*; herramienta para el análisis de datos procedentes de microarrays.
- **mg:** Miligramo.
- **ml:** Mililitros.
- **MLPA:** *Multiplex ligation-dependent probe amplification*; amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples.
- **mM:** Milimolar.
- **MMR:** *Mismatch repair genes*; genes MMR.
- ***n*:** Número de pacientes.
- **Nº:** Número.
- **NS:** No significativo.
- **NSAID:** antiinflamatorios no esteroideos.
- ***p*:** grado de significación estadística.
- **P:** Prolina.
- **p:** Proteína.
- **PAC:** *P1-derived artificial chromosome*; cromosoma artificial derivado de P1.
- **PAF:** Poliposis adenomatosa familiar.
- **Pb:** Pares de bases.
- **PCR:** *Polymerase chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa.
- **PET:** Tomografía por emisión de positrones.
- **PharmGKB:** *Pharmacogenomics knowledgebase*; base de conocimientos farmacogenómicos.
- **Pro:** Prolina.

- **Q:** Glutamina.
- **QT:** Quimioterapia.
- **R:** Arginina.
- **RAR:** *Recurrently altered regions*; regiones recurrentemente alteradas.
- **REM:** Resección endoscópica mucosa.
- **RESM:** Resección endoscópica submucosa.
- **RM:** Resonancia magnética.
- **rpm:** Revoluciones por minuto.
- **RT:** Radioterapia.
- **S:** Serina.
- **SCM:** Subtipo de consenso molecular.
- **SD:** *Standard deviation*; desviación estándar.
- **Ser:** Serina.
- **SG:** Supervivencia global.
- **SL:** Síndrome de Lynch.
- **SLE:** Supervivencia libre de enfermedad.
- **T:** Timina.
- **TAMIS:** *Transanal minimally invasive surgery*; cirugía transanal mínimamente invasiva.
- **TBE:** Tris, ácido bórico y EDTA.
- **TC:** Tomografía computerizada.
- **TEAA:** Acetato de trietilamonio.
- **TEF:** Test exacto de Fisher.
- **TEM:** *Transanal endoscopic microsurgery*; microcirugía endoscópica transanal.
- **Ter:** Terminación.
- **TIF:** Test de inmunohistoquímica fecal.
- **TSOH:** Test de sangre oculta en heces.
- **X²:** Test de Chi cuadrado.
- **YAC:** *Yeast artificial chromosomes*; cromosoma artificial de levadura.
- **µm:** Micrómetro.
- **µM:** Micromolar.
- **°C:** Grados centígrados o Celsius.
- **5-FU:** 5 fluoracilo.

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I.1. Métodos de <i>screening</i> en CCR.....	30
Tabla I.2. Sistemas de <i>screening</i> de CCR en individuos de bajo y alto riesgo, según diferentes guías de práctica clínica.....	33
Tabla I.3. Sistemas de <i>screening</i> en situaciones especiales de alto riesgo.....	35
Tabla I.4. Estadificación del CCR según la clasificación de Dukes y su correlación con la clasificación TNM.....	36
Tabla I.5. Estadificación del CCR según la clasificación TNM y los índices de supervivencia publicados en los diferentes estadios.....	37
Tabla I.6. Clasificación macroscópica para el CCR temprano de la Sociedad Japonesa para el estudio del cáncer de colon y recto y clasificación endoscópica de París de las lesiones colorrectales superficiales.....	40
Tabla I.7. Grado de invasión en lesiones polipoideas según la clasificación de Haggitt.....	41
Tabla I.8. Invasión submucosa en el CCR temprano según la clasificación de Kikuchi de lesiones planas.....	42
Tabla I.9. Indicaciones de resección endoscópica del CCR temprano.....	42
Tabla I.10. Criterios clínicos del síndrome de Lynch.....	53
Tabla III.1. Tamaño de los productos de PCR y fluorocromos empleados para el análisis de la IMS mediante el “panel de Bethesda”.....	78
Tabla III.2. Estudio de mutaciones en el gen <i>MLH1</i> . Cebadores y condiciones de desnaturalización empleadas en la amplificación e identificación del estado mutacional del gen <i>MLH1</i>	80
Tabla III.3. Estudio de mutaciones en el gen <i>MSH2</i> . Cebadores y condiciones de desnaturalización empleadas en la amplificación e identificación del estado mutacional del gen <i>MSH2</i>	81
Tabla III.4. Sondas utilizadas en <i>SALSA P003 MLH1/MSH2</i> , para el estudio de grandes deleciones cromosómicas en <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	83
Tabla III.5. Para cada exón del gen <i>MSH6</i> , cebadores, tamaño de los productos amplificados, tiempo y temperatura de amplificación de la PCR y temperatura de desnaturalización de la cromatografía de alta resolución.....	84

Tabla III.6. Clones, marca comercial y dilución utilizada para el análisis inmunohistoquímico de las proteínas MLH1, MSH2 y MSH6.....	90
Tabla III.7. Listado de genes incluidos en el panel de NGS.....	94
Tabla III.8. Fichero obtenido tras el análisis bioinformático utilizando <i>Torrent Suite™ Software e Ion Reporter™ Software</i> (Thermo Fisher Scientific Inc.).....	95
Tabla III.9. Bases de datos o recursos relevantes para la interpretación de variantes. BD: Base de datos (Modificado de Li <i>et al.</i> , 2017).....	96
Tabla III.10. Algoritmos computacionales de predicción del impacto funcional (predictores <i>in silico</i>) provocado por variantes genómicas. <i>SNV: single nucleotide variants</i> (Modificado de Li <i>et al.</i> , 2017).....	97
Tabla III. 11. Evidencias clínicas para la interpretación de variantes somáticas. <i>FDA: Food and Drug administration</i> (Li <i>et al.</i> , 2017).....	98
Tabla III. 12. Listado de genes que componen el panel de NGS agrupados por vías funcionales y procesos celulares.....	99
Tabla IV.1. Características clínicas, familiares y anatomopatológicas globales del CCRAT.....	107
Tabla IV.2. Características moleculares globales del CCRAT.....	110
Tabla IV.3. Características clínicas, familiares y anatomopatológicas del CCRAT, según su localización tumoral.....	113
Tabla IV.4. Características moleculares del CCRAT según su localización tumoral.....	116
Tabla IV.5. Características clínicas, familiares y anatomopatológicas globales del CCRJ según su localización tumoral.....	118
Tabla IV.6. Características moleculares globales del CCRJ según su localización tumoral.....	119
Tabla IV.7. Análisis comparativo de la distribución por sexo del CCRJ y del CCRAT según la localización tumoral.....	121
Tabla IV.8. Análisis comparativo de la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia global, la recidiva tumoral y la mortalidad global en el CCRJ y en el CCRAT, según la localización tumoral.....	123
Tabla IV.9. Análisis comparativo de los antecedentes familiares en el CCRJ y en el CCRAT, según la localización tumoral.....	125
Tabla IV.10. Análisis comparativo de la estadificación tumoral de la clasificación AJCC/TNM en el CCRJ y en el CCRAT, según la localización tumoral.....	127

Tabla IV.11. Análisis comparativo de la IMS, la mutación en genes MMR y el estado mutacional de <i>BRAF</i> en el CCRJ y en el CCRAT, según la localización tumoral.....	129
Tabla IV.12. Análisis comparativo del fenotipo metilador y la clasificación molecular según la IMS y el CIMP en el CCRJ y en el CCRAT, según la localización tumoral.....	131
Tabla IV.13. Análisis comparativo de la inestabilidad cromosómica en el CCRJ y en el CCRAT, según la localización tumoral.....	133
Tabla IV.14. Análisis comparativo de las regiones recurrentemente alteradas en el CCRJ y el CCRAT, según la localización tumoral.....	136
Tabla IV. 15. Análisis mediante NGS de variantes somáticas en CCRJ y CCRAT.....	138
Tabla IV.16. Resumen de los resultados en el cáncer de colon derecho según la edad de aparición.....	141
Tabla IV.17. Resumen de los resultados en el cáncer de colon izquierdo según la edad de aparición.....	143
Tabla IV.18. Resumen de los resultados en el cáncer de recto según la edad de aparición.....	144

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura I.1A. Incidencia global del CCR, ajustada a la edad.....	1
Figura I.1B. Índice de mortalidad global del CCR, ajustado a la edad.....	2
Figura I.2. Incidencia del CCR en adultos jóvenes entre 20 y 49 años durante el periodo comprendido entre los años 2008 y 2012.....	3
Figura I.3. Diferencias en la tendencia de la incidencia del CCRJ a nivel global.....	4
Figura I.4. Vías de carcinogénesis colorrectal.....	7
Figura I.5. Sistema de reparación de errores mediante bucles de inserción/delección...	11
Figura I.6. Características moleculares del CCRJ (figura I-6A) y del CCRAT (figura I-6B).....	17
Figura I.7. Factores de riesgo de CCR modificables y no modificables.....	19
Figura I.8. Secuencia pólipo-adenocarcinoma.....	21
Figura I.9. Imagen de colonoscopia de pólipo colónico plano.....	26
Figura I.10. Imágenes de colonoscopia de pólipos pediculados.....	26
Figura I.11. Imagen de una neoplasia de recto avanzada con infiltración prostática (uT4N0) visualizada por TC (imagen A) y por RM (imagen B).....	28
Figura I.12. Imagen de una neoplasia de recto por ecografía endorrectal.....	29
Figura I.13. Clasificación de Haggitt de las lesiones malignas colorrectales polipoideas (izquierda) y sésiles (derecha).....	41
Figura I.14. Clasificación de Kikuchi del grado de invasión submucosa en las lesiones malignas colorrectales planas.....	42
Figura I.15. Características diferenciales del CCRD (ciego, colon ascendente, colon transversal proximal) y CCRI (ángulo esplénico, colon descendente, colon sigmoide y recto).....	59
Figura III.1. Resultados del análisis de un ADN normal (A) y de una muestra tumoral clasificada como inestable para todos los marcadores microsatélites analizados (B)..	79
Figura III.2. Esquema representativo de una columna del sistema WAVE®.....	86
Figura III.3. Ejemplo de análisis de las mutaciones en el gen <i>MSH6</i> mediante cromatografía de alta resolución (dHPLC).....	87
Figura III.4. Ejemplo de la secuenciación de un caso positivo para hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i> en uno de sus alelos.....	89
Figura III.5. Estructura de una placa de microarray CGH para el análisis de la IC (formato 12x135, Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia).....	91
Figura VIII.1. Condiciones de tiempo y temperatura para el análisis de la IMS aplicadas en el protocolo de PCR <i>multiplex</i>	193

Figura VIII.2. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la PCR para el estudio de las mutaciones en los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	194
Figura VIII.3. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la PCR para el estudio de grandes deleciones genómicas en <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	195
Figura VIII.4. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la PCR para el estudio de las mutaciones en el gen <i>MSH6</i>	196
Figura VIII.5. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura para para la realización de la PCR para el estudio de la hipermetilación del promotor del gen <i>MSH1</i>	198
Figura VIII.6. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la técnica HRM para el estudio del estado mutacional de <i>BRAF</i>	200
Figura VIII.7. Condiciones de tiempo y temperatura utilizadas para realizar las amplificaciones de las regiones de interés del panel de NGS.....	201
Figura VIII.8. Condiciones de tiempo y temperatura para llevar a cabo la digestión parcial de los <i>primers</i>	201
Figura VIII.9. Condiciones de tiempo y temperatura para llevar a cabo la ligación de los adaptadores en el panel de NGS.....	201
Figura VIII.10. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura para realizar la cuantificación de las librerías.....	202

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores más frecuentes, suponiendo la segunda neoplasia diagnosticada en mujeres y la tercera en varones, siendo la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en el mundo. Su incidencia se encuentra en aumento, fundamentalmente en el grupo de pacientes jóvenes (menores de 50 años) con un descenso, en contraste, en la incidencia y mortalidad global en los pacientes mayores de 50 años.

En la actualidad, el diagnóstico y el tratamiento del CCR se realiza únicamente en base a criterios anatómicos y de estadificación tumoral, a pesar de la evidencia reciente del papel de la biología del tumor y de sus características genéticas en la progresión tumoral y la respuesta al tratamiento. Múltiples estudios han establecido las diferencias a nivel molecular según la localización tumoral en el colon y el recto, aunque sin tener en cuenta el criterio de edad.

Por este motivo, el CCR debe ser considerado como una enfermedad heterogénea, con diferencias clínicas, moleculares y genéticas en base a los diferentes grupos de edad y la localización tumoral. Hasta la fecha, las investigaciones se han dirigido fundamentalmente al CCR en general, aunque en los últimos años existe un interés creciente en el grupo de pacientes jóvenes, dado el aumento en la incidencia y su peor pronóstico general, evidenciando la necesidad de este tipo de estudios comparativos con pacientes mayores, en especial a la hora de evaluar las diferencias existentes según la localización tumoral.

OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es el análisis de las características anatomoclínicas, familiares y moleculares de una población de pacientes con CCR de aparición tardía (mayores de 70 años) (CCRAT), según su localización tumoral en el colon y el recto, y la comparación con los datos del grupo de pacientes jóvenes (menores de 45 años) (CCRJ).

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 88 pacientes consecutivos diagnosticados de CCR a edad ≤ 45 años y 97 pacientes consecutivos diagnosticados de CCR a edad ≥ 70 años, entre los años 2002 y 2008, con un seguimiento de, al menos, 5 años tras el diagnóstico. Se estudiaron las características anatomoclínicas, familiares y moleculares en el grupo de pacientes mayores de 70 años y, posteriormente, se compararon con los datos del grupo de pacientes menores de 45.

Se analizaron variables demográficas e histológicas, así como del seguimiento de los casos y los antecedentes familiares oncológicos de cada caso. Desde el punto de vista molecular, se realizó el análisis inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras de ADN y la inestabilidad de microsatélites (IMS), clasificando los casos como IMS o EMS (estabilidad de microsatélites). En los casos con IMS, se completó el estudio de mutaciones en los genes reparadores de ADN (MMR) y en *BRAF*, a la hora de definir los casos de síndrome de Lynch (SL) o aquellos esporádicos con IMS. Además, se realizó el estudio de patrones de metilación y se clasificaron los tumores según la clasificación molecular del CCR. Se llevó a cabo el estudio de la IC mediante la técnica de CGH (*comparative genomic hybridization*; hibridación genómica comparada) array. Finalmente, se realizó el estudio mediante NGS (*next generation sequencing*) para el análisis de posibles variantes somáticas tumorales.

RESULTADOS

En el grupo de CCRAT la edad media al diagnóstico fue de 77.9 años, con distribución similar entre sexos. La localización menos frecuente fue el colon izquierdo (22.7%), con elevada asociación de pólipos previos o durante el seguimiento (63.9%). Los tumores fueron de predominio esporádico, con escasos antecedentes familiares (12.4%). A nivel histopatológico, destaca la baja presencia de tumores pobremente diferenciados, con predominio de componente mucinoso (19.8%). Fueron predominantes los tumores de colon derecho en mujeres (65.8 %), localización con mayor componente mucinoso. La peor supervivencia global (SG) se objetivó en las localizaciones derecha y rectal (45.9 y 31.6 meses de media, respectivamente).

A nivel molecular, el CCRAT presentó escasa IMS (9.3%), fundamentalmente asociada a mutaciones en *BRAF*^{V600E}, con baja presencia de fenotipo metilador, siendo los casos con CIMP-alto aquellos con IMS de tipo esporádico. El 35% de los pacientes no presentó ninguna alteración en cromosomas enteros, destacando una alteración en

el número de copias (ANC) por caso menor del 50%. El mayor porcentaje de IMS se objetivó en el colon derecho (18.4%), siendo todos los tumores rectales estables. El recto presentó el mayor estado de metilación, con un 36.4% de los tumores de tipo CIMP-alto, aunque en todas las localizaciones predominó la EMS-CIMP-bajo. La IC fue mayor en los tumores de colon derecho, no solo a expensas del IIG, sino también en cuanto a la ANC por caso, con un llamativo bajo índice de IC en los tumores izquierdos.

En el análisis comparativo según la edad y la localización tumoral, los tumores de colon derecho fueron predominantes en mujeres a nivel global, con la mejor SG y supervivencia libre de enfermedad (SLE) en el CCRJ (180 y 72.4 meses de media, respectivamente), a pesar del bajo grado de diferenciación y componente mucinoso. Aunque predomina la EMS a nivel global, se observa IMS en el 30% del CCRJ, con la mayor proporción de pacientes con SL. El 18% del CCRAT presentó IMS, la mayoría asociada a mutaciones en *BRAF*^{V600E}. Se evidenció predominio de CIMP-alto en el CCRJ, siendo la mayoría del CCRAT derecho de tipo EMS-CIMP-0/bajo (75%). La mayoría de las regiones cromosómicas recurrentemente alteradas se evidenciaron en el CCRAT, con mayor índice de inestabilidad genómica (IIG) y media de cromosomas completos alterados.

El colon izquierdo fue la localización más prevalente en el CCRJ (43%), con características clínicas y familiares transicionales entre el colon derecho y el recto. Destaca la mayor presencia de pólipos asociados en el CCRAT, con una mayor proporción de neoplasias sincrónicas y/o metacrónicas. A nivel global predomina la EMS-CIMP-0/bajo, con un 17% de IMS y SL en el CCRJ. La ANC por caso y la media de cromosomas completos alterados fueron superiores en el CCRJ.

El recto presentó la peor SG y SLE a nivel global, especialmente en el CCRAT (31.67 y 16.25 meses de media, respectivamente), a pesar de que el CCRJ presentó el peor estadiaje tumoral al diagnóstico (37% en estadio IV). El 67% del CCRAT presentó pólipos asociados. Todos los pacientes presentaron EMS, aunque con un 52% de agregación familiar (sin cumplir criterios de SL) en el CCRJ. Se evidenció CIMP-alto en el 36.4% del CCRAT, predominando los tumores EMS-CIMP-0/bajo a nivel global y destacando escasa IC en ambos grupos.

En el análisis de las mutaciones somáticas mediante NGS, únicamente fue significativa la elevada presencia de mutaciones en *KRAS* en el grupo de CCRAT (58% de las muestras tumorales presentaron mutación en *KRAS*), especialmente en las localizaciones derecha (73%) y rectal (63%).

CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos sugieren que el CCR es una entidad heterogénea, con características diferenciales desde el punto de vista clínico, familiar, anatomopatológico y molecular, con importantes diferencias según la edad de diagnóstico y la localización tumoral. El presente estudio destaca las diferencias en las bases moleculares del CCR según la edad y la localización en el colon, siendo el conocimiento de las características específicas de cada grupo fundamental para un posible futuro manejo terapéutico individualizado de esta patología.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common tumors, being the second most common neoplasia diagnosed in women and the third in men, and the second cause of cancer-related death in the world. Its incidence is increasing, mainly in the group of young patients (under 50 years of age) with a decrease, in contrast, in the incidence and overall mortality in patients over 50 years of age.

Currently, the diagnosis and treatment of CRC is carried out mainly based on anatomical and tumor staging criteria, despite recent evidence of the role of tumor biology and its genetic characteristics in tumor progression and treatment response. Multiple studies have established differences at the molecular level according to tumor location in colon and rectum, although without considering the age criterion.

For this reason, CRC should be considered a heterogeneous disease, with clinical, molecular and genetic differences based on the different age groups and tumor location. To date, research has focused primarily on CRC in general, although in recent years there has been a growing interest in the group of young patients, given the increase in incidence and their worse prognosis, showing the need for this type of comparative studies with older patients, especially evaluating the differences according to the tumor location.

OBJECTIVES

The main objective of the study is the analysis of the anatomoclinical, familial and molecular characteristics of a population of patients with late-onset CRC (over 70 years of age) (LOCRC), according to their tumor location in colon and rectum, and the comparison with the data of the group of early-onset CRC (under 45 years of age) (EOCRC).

MATERIAL AND METHODS

A retrospective study of 88 consecutive patients diagnosed with CRC at age ≤ 45 years and 97 consecutive patients diagnosed with CRC at age ≥ 70 years, between 2002 and 2008, with a follow-up of at least 5 years after diagnosis. The anatomoclinical, familial and molecular characteristics were studied in the group of patients over 70 years

of age and were subsequently compared with the data of the group of patients under 45 years of age.

Demographic and histological variables were analyzed, as well as the follow-up and the oncological family history of each case. From the molecular point of view, immunohistochemical analysis of DNA repair proteins and microsatellite instability (MSI) was performed, classifying the cases as MSI or microsatellite stability (MSE). In the cases with MSI, the study of mutations in mismatch repair genes (MMR) and *BRAF* was completed, when defining the cases of Lynch syndrome (LS) or those sporadic with MSI. In addition, the study of methylation patterns was carried out and the tumors were classified according to the molecular classification of CRC. The chromosomal instability (CI) study was carried out using the comparative genomic hybridization (CGH) array technique. Finally, the study of possible tumor somatic variants was carried out using NGS (next generation sequencing) analysis.

RESULTS

In the LOCRC group, the mean age at diagnosis was 77.9 years, with a similar distribution between sex. The least frequent location was the left colon (22.7%), with a high association of previous polyps or during follow-up (63.9%). The tumors were predominantly sporadic, with low family history (12.4%). At the histopathological level, the low presence of poorly differentiated tumors stands out, with a predominance of a mucinous component (19.8%). Right colon tumors were predominant in women (65.8%), a location with a greater mucinous component. The worst overall survival (OS) was observed in the right and rectal locations (45.9 and 31.6 months on average, respectively).

At the molecular level, LOCRC showed low MSI (9.3%), mainly associated with mutations in *BRAF*^{V600E}, with a low presence of methylator phenotype, with cases with CIMP-high being those with sporadic MSI. The 35% of patients did not present any alteration in entire chromosomes, with a copy number of alterations (CNA) per case less than 50%. The highest percentage of MSI was observed in the right colon (18.4%), with all rectal tumors being stable. The rectum presented the highest methylation status, with 36.4% of CIMP-high tumors, although EMS-CIMP-low predominated in all locations. The CI was higher in right colon tumors, not only due to the genomic instability index (GII), but also in terms of CNA per case, with a strikingly low CI rate in left tumors.

In the comparative analysis according to age and tumor location, right colon tumors were predominant in women overall, with the best OS and disease-free survival

(DFS) in the EOCRC (180 and 72.4 months on average, respectively), despite the low degree of differentiation and mucinous component. Although MSE predominates overall, MSI was observed in 30% of the EOCRC, with the highest proportion of patients with LS. 18% of the LOCRC presented MSI, the majority associated with mutations in *BRAF*^{V600E}. A predominance of CIMP-high was evident in the EOCRC, with the majority of the right LOCRC being of the MSE-CIMP-0/low type (75%). The majority of the recurrently altered chromosomal regions were evident in the LOCRC, with a higher GII and mean number of altered complete chromosomes.

The left colon was the most prevalent location in the EOCRC (43%), with clinical and familial characteristics transitioning between the right colon and the rectum. The greater presence of associated polyps in the LOCRC is notable, with a higher proportion of synchronous and/or metachronous neoplasia. Overall, MSE-CIMP-0/low predominates, with 17% of MSI and LS in the EOCRC. The CNA per case and the mean of altered complete chromosomes were higher in the EOCRC.

The rectum had the worst OS and DFS overall, especially in the LOCRC (31.67 and 16.25 months on average, respectively), even though the EOCRC had the worst tumor staging at diagnosis (37% in stage IV). 67% of the LOCRC had associated polyps. All patients had MSE, although with 52% familial aggregation (not meeting LS criteria) in the EOCRC. CIMP-high was evident in 36.4% of LOCRC, with MSE-CIMP-0/low tumors predominating overall and low CI being notable in both groups.

In the analysis of somatic mutations using NGS, only the presence of *KRAS* mutations in the LOCRC group was significant (58% of the tumor samples had a *KRAS* mutation), especially in the right (73%) and rectal (63%) locations.

CONCLUSIONS

Our findings suggest that CRC is a heterogeneous entity, with differential characteristics from the clinical, familial, anatomopathological and molecular point of view, with remarkable differences according to the age of diagnosis and tumor location. The present study highlights the differences in the molecular bases of CRC according to age and location in the colon, being the knowledge of the specific characteristics of each group essential for a possible future individualized therapeutic management of this pathology.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) supone aproximadamente el 10% de todas las neoplasias diagnosticadas anualmente y de las muertes relacionadas con cáncer a nivel mundial (Siegel RL *et al.*, 2024). Es la segunda neoplasia diagnosticada más frecuente en mujeres y la tercera en varones, siendo la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en el mundo, suponiendo aproximadamente 900.000 muertes anuales (GLOBOCAN). En las mujeres, la incidencia y mortalidad es un 25% menor que en los varones (GLOBOCAN).

La incidencia y mortalidad también varían según la región geográfica, siendo más frecuente en países más desarrollados (figuras I-1A y I-1B), con una predicción de aumento de 2 a 5 millones de casos en el año 2035 (Bray F *et al.*, 2018; Arnold M *et al.*, 2017). Los cambios en la dieta y el estilo de vida, el avance en los sistemas de *screening* y la realización sistemática de endoscopias diagnósticas en la población general explican en parte este aumento en la incidencia en las últimas décadas, fundamentalmente a expensas de tumores en estadios precoces. No obstante, también se observa un creciente aumento del CCR en la población menor de 50 años, especialmente en el caso del cáncer de recto y el cáncer de colon izquierdo (Siegel RL *et al.*, 2017; Kasi PM *et al.*, 2019).

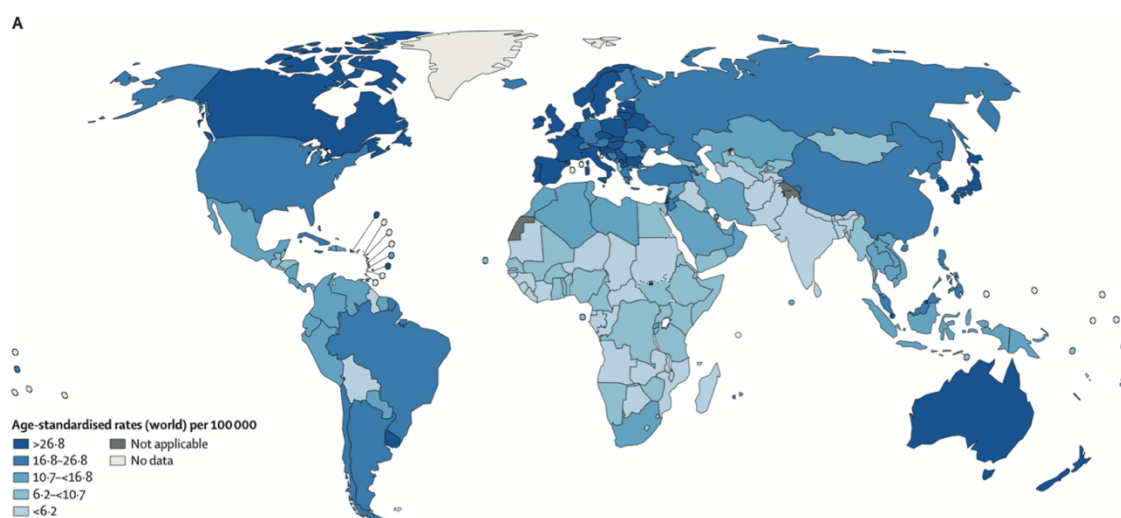


Figura I.1A. Incidencia global del CCR, ajustada a la edad (Bray F *et al.*, 2018).

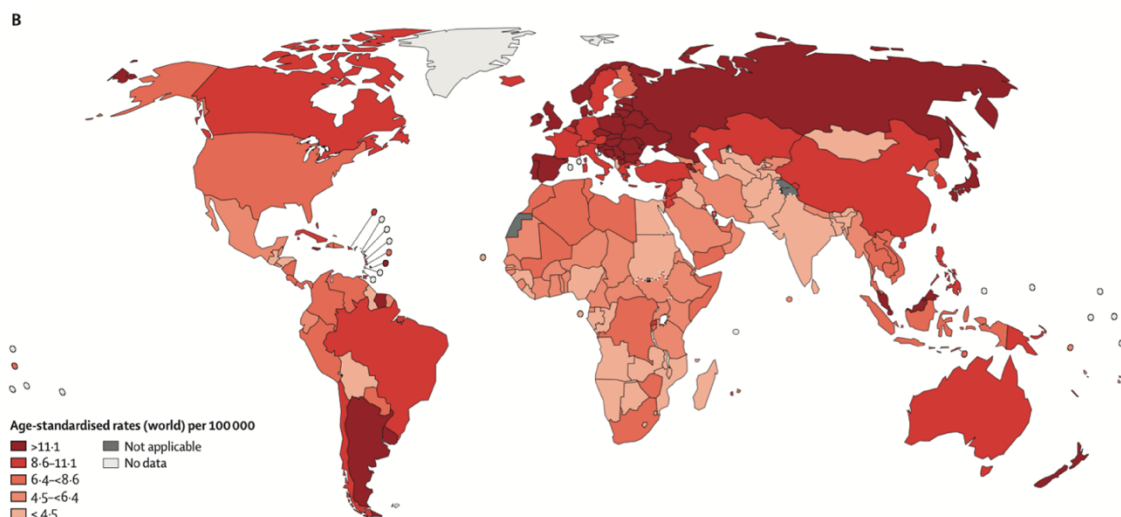


Figura I.1B. Índice de mortalidad global del CCR, ajustado a la edad (Bray F *et al.*, 2018).

La incidencia del CCR se estima en aumento del 2.4% anual en adultos entre 20 y 29 años, 1% anual entre 30 y 39 años y 1.3% anual entre 40 y 49 años (Siegel RL *et al.*, 2017). En contraste, se evidencia un descenso en la incidencia y mortalidad global en los pacientes mayores de 65 años, probablemente en relación con los avances en los sistemas de *screening* implementados en la mayoría de los países desarrollados en los últimos años.

Por este motivo, el CCR en conjunto debe ser considerado como una enfermedad biológicamente heterogénea, con diferencias clínicas, moleculares y genéticas en base a los diferentes grupos de edad, lo cual permite subclasificar el CCR según la edad de aparición (Perea J *et al.*, 2014).

1.1. Incidencia del CCR en el adulto joven

El CCR en jóvenes (CCRJ) se define como aquel diagnosticado a una edad inferior a la edad de recomendación de inicio de los programas de *screening*, es decir, a partir de los 50 años (Cyhaniuk A y Coombes ME, 2019). Clásicamente, los esfuerzos de *screening* en este grupo de población han estado encaminados a los pacientes con factores hereditarios y síndromes predisponentes a cáncer, así como en los casos con antecedentes familiares de primer grado con CCR, cuya edad de *screening* se reduce a

los 40 años (Gupta S, 2022), evidenciando un creciente aumento de los pacientes con CCR esporádico, no incluido en los sistemas de detección precoz.

En la actualidad se estima que el CCR esporádico en jóvenes supone el 70% de los pacientes con CCRJ (Patel SG *et al.*, 2022). Recientes estudios indican que el CCRJ ha aumentado entre un 2.8 y un 36.5% en las últimas décadas, sin haberse observado un aumento en la incidencia del CCR hereditario (Ganapathi S *et al.*, 2011; Loomans-Kropp y Umar A, 2019). Esta tendencia al alza se observa mayoritariamente en Europa, Estados Unidos, Australia y Canadá (Siegel RL *et al.*, 2019) (figura I-2), con índices de mortalidad relacionada con cáncer también en aumento en este grupo de edad (Vuik FE *et al.*, 2019).

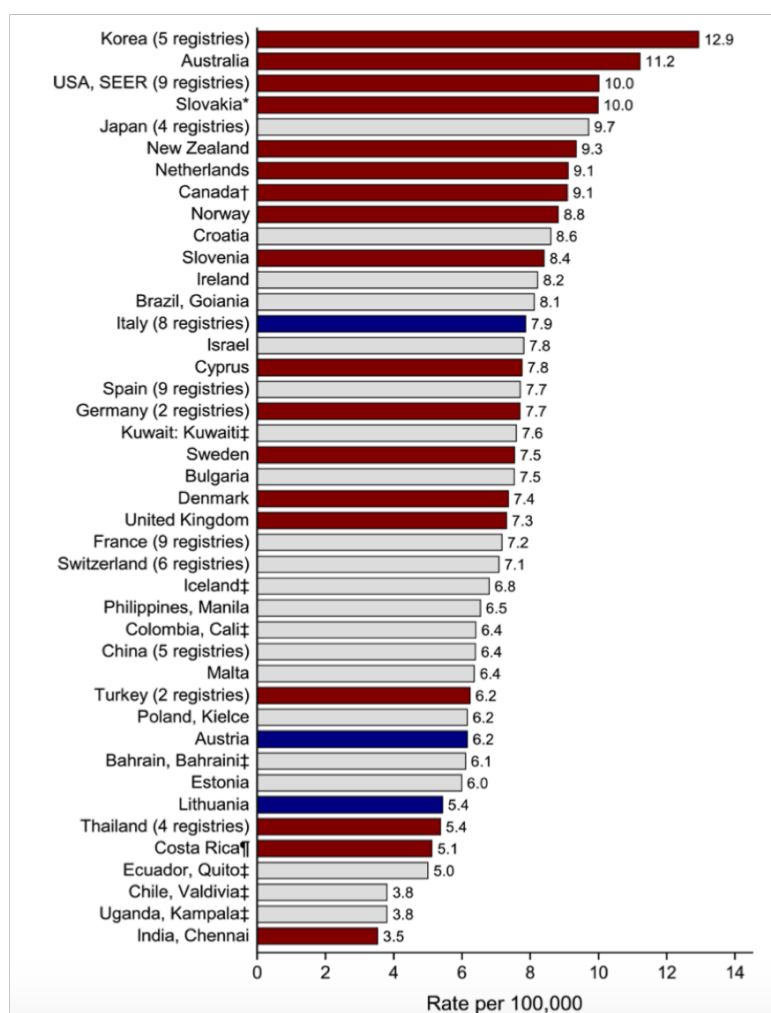


Figura I.2. Incidencia del CCR en adultos jóvenes entre 20 y 49 años durante el periodo comprendido entre los años 2008 y 2012.

Rojo: incremento significativo; azul: descenso significativo; gris: estable. ‡ Número de casos insuficiente para establecer el análisis. * Datos recogidos entre los años 2008 y 2010. † Excluidos Nunavut, Quebec y Yukon. ¶ Datos recogidos entre los años 2008 y 2011 (Siegel RL *et al.*, 2019).

I. INTRODUCCIÓN

En Estados Unidos se estima que aproximadamente el 10% del CCR se diagnostica en pacientes menores de 50 años, encontrándose el 75% de los casos en el rango de edad comprendido entre los 40 y los 49 años, siendo la edad media al diagnóstico de 44 años (You YN *et al.*, 2012). La base de datos “*Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER)*” mostró entre 1973 y 1999 un aumento de la incidencia del cáncer de colon y recto en individuos entre 20 y 40 años del 17 y 75%, respectivamente, con un incremento continuado del 1.5% anual en varones y del 1.6% anual en mujeres entre 1992 y 2005, más acusado en el caso del cáncer de recto (O'Connell JB *et al.*, 2003). Las últimas actualizaciones de dicha base de datos continúan mostrando un incremento en la incidencia del CCRJ del 1.6% anual entre los años 2000 y 2013 (Siegel RL *et al.*, 2017).

Basándonos en las tendencias objetivadas hasta la actualidad, se puede estimar que en el año 2030 la incidencia del cáncer de colon y recto se incrementará un 90% y un 124%, respectivamente, en pacientes con edades comprendidas entre los 20 y los 34 años; con un incremento del 27.7% y del 46%, respectivamente, en el grupo de edad comprendido entre los 35 y los 49 años (Ashktorab H *et al.*, 2017; Bailey CE *et al.*, 2015). Podemos observar incrementos similares en Australia, Canadá y Europa, por lo que no existe duda acerca del aumento de la incidencia global de esta enfermedad, con algunas variaciones según la región geográfica, como se puede observar en la figura I-3. No obstante, hay que tener en cuenta la ausencia de registros nacionales en múltiples países y la dificultad para la obtención de datos globales en algunas regiones en relación con el nivel socioeconómico y el componente hereditario, los cuales pueden resultar en factores de confusión de la incidencia real del CCR en este grupo de edad.

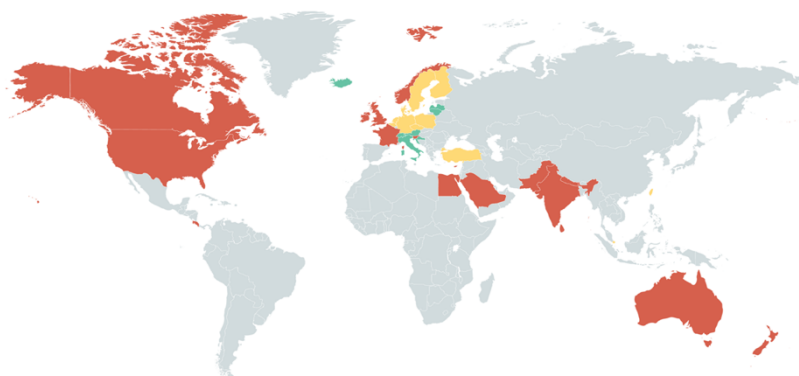


Figura I.3. Diferencias en la tendencia de la incidencia del CCRJ a nivel global.

Rojo: aumento elevado de la incidencia. Amarillo: aumento moderado de la incidencia. Verde: descenso o estabilización de la incidencia (Datta RV, LaQuaglia MP y Paty PB, 2000).

Junto a este importante aumento de la incidencia global, la falta de sistemas de *screening* en la población joven da como resultado un retraso en el diagnóstico, con pacientes en estadios más avanzados y con tumores pobremente diferenciados, lo cual empeora su pronóstico global (Datta RV, LaQuaglia MP y Paty PB, 2000).

1.2. Incidencia del CCR de aparición tardía

Si bien en el adulto joven está bien establecido el criterio en cuanto a edad de clasificación, en pacientes mayores existe una importante discrepancia entre autores en cuanto a la definición del cáncer colorrectal de aparición tardía (CCRAT) (Pilozzi E *et al.*, 2015). Muchos autores establecen la definición de CCRAT en pacientes mayores de 50 años, en los que ya se ha establecido un programa de *screening* y en el que, por tanto, es posible valorar las diferencias en cuanto a incidencia respecto al grupo joven. Sin embargo, otros autores definen el CCRAT como aquel diagnosticado en pacientes mayores de 70 años, estableciendo este punto de corte en base a las características clínicas, moleculares y genéticas que se observan específicamente en este grupo de edad y que se encuentran claramente diferenciadas con respecto al grupo de pacientes jóvenes (Zaborowski AM *et al.*, 2021).

La incidencia y mortalidad del CCRAT ha disminuido significativamente en las últimas décadas, objetivándose un descenso del 32% en la incidencia y del 34% en la mortalidad en Estados Unidos entre los años 2000 y 2013 (Siegel RL *et al.*, 2017). Este descenso puede atribuirse fundamentalmente, y como se ha mencionado previamente, al aumento de los programas de *screening* y los avances en el tratamiento global del CCR (Tong L *et al.*, 2014).

2. Bases moleculares del CCR

En 1990, Fearon y Vogelstein (Fearon ER y Vogelstein B, 1990) propusieron por primera vez el modelo de carcinogénesis del CCR como una gran diversidad de cambios genéticos y epigenéticos cuya consecuencia es el inicio y progresión de la secuencia de adenoma-carcinoma. De todos los tumores malignos, el CCR presenta una de las mayores tasas de mutaciones, resultando en una enfermedad heterogénea con docenas

de mutaciones somáticas, en la que podrían distinguirse dos grandes grupos de tumores: los tumores hipermutados (> 12 mutaciones por 10^6 bases) y los tumores no-hipermutados ($< 8,24$ mutaciones por 10^6 bases) (*The Cancer Genome Atlas Network*, 2012). En un esfuerzo por subclasificar los perfiles de expresión genética se ha establecido un sistema de clasificación que incluye 4 subtipos de consenso molecular (SCM 1-4). Cada SCM presenta características histopatológicas y clínicas particulares (Guinney J *et al.*, 2015; Sadanandam A *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque los tumores colorrectales son muy heterogéneos a nivel genético, parece que se desarrollan mediante tres vías principales de carcinogénesis. Las vías descritas actualmente son la inestabilidad cromosómica (IC), la inestabilidad de microsatélites (IMS) y la vía serrada o fenotipo metilador, aunque en muchos casos se solapan entre sí (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

2.1. Secuencia adenoma-carcinoma

La mayoría del CCR se desarrolla a partir de pólipos precancerosos, como adenomas tubulares o pólipos serrados. Este tipo de pólipos se desarrollan cuando existen alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN y de la proliferación celular. En condiciones normales, el epitelio intestinal se encuentra en constante recambio. Cuando se aprecia la existencia de células epiteliales mutadas, si los mecanismos de reparación y apoptosis celular fallan, el resultado será la aparición de una alteración discreta en la mucosa de tipo adenomatoso. Con el tiempo, este adenoma acumulará diferentes alteraciones displásicas, aumentará de tamaño y podrá adquirir potencial invasor (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

De esta forma, alteraciones secuenciales en los genes reguladores del crecimiento marcan la transición desde un epitelio normal a la proliferación polipoidea. Este tipo de carcinogénesis secuencial, con adición progresiva de diferentes mutaciones genéticas, es el paradigma actual de crecimiento de la mayoría de los tumores sólidos. Las mutaciones en el gen de poliposis adenomatosa coli (*APC*, *Adenomatous Polyposis Coli*) (Sparks AB *et al.*, 1998) o las mutaciones en el oncogén *BRAF* (Davies H *et al.*, 2002) son eventos de iniciación habituales que darán como resultado la aparición de un pólipo adenomatoso o serrado, respectivamente. La progresión de eventos posterior marcará la vía de carcinogénesis de cada tipo de tumor (figura I-4) (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

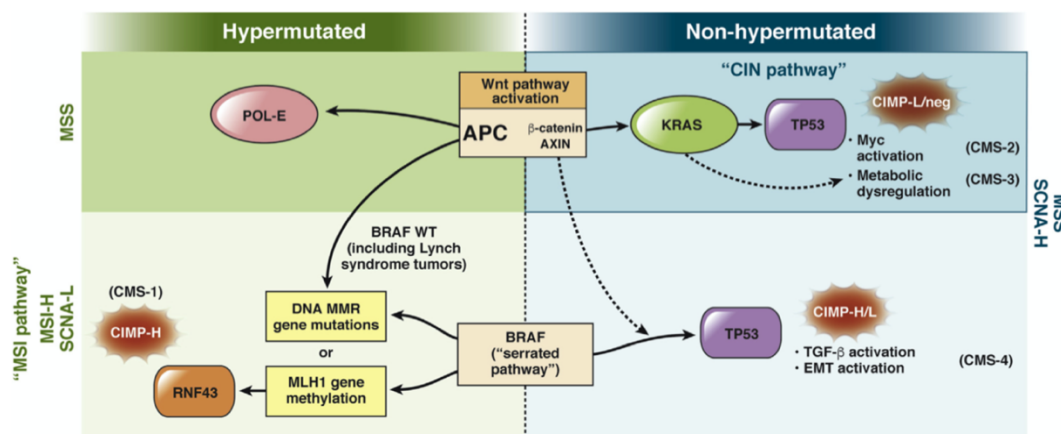


Figura I.4. Vías de carcinogénesis colorrectal. La activación de la vía Wnt (a través de la mutación en APC) o la mutación en BRAF inician la carcinogénesis. Las mutaciones en BRAF activan la vía serrada, destacando la inestabilidad de microsatélites (IMS) con hipermutación o estabilidad de microsatélites (EMS) sin hipermutación (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

H, alto; *L*, bajo; *Neg*, negativo. *EMT*, transición epitelial a mesenquimal (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

2.2. Vías principales de carcinogénesis

2.2.1. Inestabilidad cromosómica

La vía de la IC supone el 65-70% de todos los CCR de tipo esporádico (Grady WM y Carethers JM, 2008). Se caracteriza por cambios cromosómicos incluyendo alteraciones en el número de copias somáticas (ANCS), tales como aneuploidías, deleciones, ganancias, amplificaciones o la pérdida de la heterocigosidad. Los tumores que se desarrollan a partir de esta vía se consideran como no-hipermutados debido a la relativa escasez de pares de bases mutadas en sus secuencias de codificación (figura I-4) (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

La mayoría de los fenómenos que inducen a la aparición de la IC se producen durante los procesos de segregación cromosómica y se complementan con alteraciones en los genes supresores de tumores, como APC y TP53 y activando mutaciones en proto-oncogenes, como KRAS y PIK3CA.

El primer fenómeno en la mayoría de los procesos de carcinogénesis colorrectal suele ser la mutación en *APC* (Powell SM *et al.*, 1992). La vía de señalización de Wnt es un importante regulador de la proliferación del epitelio intestinal y ésta se encuentra alterada en prácticamente todos los tumores con IC, mientras que la mutación en *APC* se describe en aproximadamente el 80% de los casos (*The Cancer Genome Atlas Network*, 2012; Guinney J *et al.*, 2015).

Los tumores clasificados dentro del SCM-2 se caracterizan por la activación de las vías de señalización de Wnt y MYC y frecuentes ANCS, características que coinciden con el fenotipo de la IC (Guinney J *et al.*, 2015).

MYC es uno de los componentes de un complejo de transcripción que regula procesos de progresión del ciclo celular, metabolismo celular y apoptosis. Las amplificaciones de *MYC* son frecuentes en el CCR y su expresión puede ser regulada por la activación de la vía de Wnt (He TC *et al.*, 1998), pero no se ha demostrado una asociación entre el nivel de proteína c-MYC en el tumor y la supervivencia o tiempo de supervivencia libre de enfermedad (He WL *et al.*, 2018).

KRAS es un componente de las vías de señalización de muchos factores de crecimiento, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermic Growing Factor Receptor*, EGFR). En esta vía, la activación de *KRAS* induce la activación de las kinasas ERK y PI3K y la transcripción del factor nuclear NF-kB, cuyo resultado final será la producción de enzimas que favorecen la progresión del ciclo celular (Pruitt K y Der CJ, 2001). Esta vía se encuentra alterada en gran cantidad de tumores, no solo colorrectales, y puede ser utilizada como diana terapéutica, especialmente en tumores colorrectales metastásicos. Igualmente, los fármacos inhibidores del EGFR se utilizan en gran cantidad de tumores metastásicos, pero no serán efectivos en tumores colorrectales con mutación de *BRAF* y *KRAS*, dado que estos tumores mantienen activada esta vía (Lièvre A *et al.*, 2006; Lièvre A *et al.*, 2008).

Existe una relación entre las mutaciones en *KRAS* y el SCM3 (también llamado fenotipo metabólico). Los tumores englobados en SCM3 se caracterizan por presentar IC, pero también un menor número de ANCS que el SCM2. El análisis de los tumores del grupo SCM3 evidencia una disregulación en determinadas vías metabólicas que

incluyen azúcares, aminoácidos, lisofosfolípidos y ácidos grasos. La activación de *KRAS* favorece el metabolismo de la glucosa y los procesos de hipoxia (Ying H *et al.*, 2012; McDonald PC *et al.*, 2019).

Muchos tumores colorrectales con mutaciones en *KRAS* también se asocian a mutaciones en PI3K. PI3K es una kinasa que fosforila una molécula de señalización celular, la cual puede inducir un aumento en la producción de prostaglandinas, inhibiendo los fenómenos de apoptosis en células tumorales colorrectales (Wang D *et al.*, 2015). Aproximadamente en el 10-20% de los tumores colorrectales podemos encontrar mutaciones activadoras en *PIK3CA* que asientan sobre la secuencia adenoma-carcinoma (Liao X *et al.*, 2012). Las mutaciones en *PIK3CA* se asocian con tumores en mujeres, de localización proximal, con predominio de IMS y mutaciones en *KRAS* (Benvenuti S *et al.*, 2008; Nosho K *et al.*, 2008).

La ciclooxygenasa 2 (COX-2) también se encuentra relacionada con la carcinogénesis colorrectal. COX-2 es un mediador de la respuesta enzimática localizada en la membrana nuclear. Puede ser activada por citoquinas y otros estímulos y se encuentra sobreexpresada en algunos adenomas y CCR, sin haber encontrado, no obstante, evidencia de la presencia de mutaciones somáticas en el análisis de tumores colorrectales (Eberhart CE *et al.*, 1994). COX-2 regula procesos de angiogénesis y vascularización tumoral (Eberhart CE *et al.*, 1994) evidenciándose durante las etapas iniciales de la carcinogénesis un aumento de su expresión (Oshima M *et al.*, 1996; Nakagawa H *et al.*, 2004). Este hallazgo se encuentra en relación con la recomendación del uso de fármacos inhibidores de COX, como antiinflamatorios no esteroideos, para la alteración de la secuencia adenoma-carcinoma y la reducción del riesgo de CCR (Steinbach G *et al.*, 2000).

TP53 es el gen más frecuentemente mutado en el cáncer de forma global. Su producto, P53, regula la transcripción de genes encargados de la reparación del ADN y de la respuesta celular al estrés oxidativo. Además, existe una asociación entre la frecuencia de mutaciones en *TP53* y la estadificación de la lesión, indicativa de que las formas mutantes de P53 promueven el desarrollo tumoral en etapas tardías de la carcinogénesis (Baker SJ *et al.*, 1990). Aproximadamente el 60% de los tumores con IC presentan mutaciones inactivadoras en *TP53* (*The Cancer Genome Atlas Network*, 2012).

2.2.2. Inestabilidad de microsatélites (IMS)

A diferencia de la vía de la IC, caracterizada por una elevada frecuencia de ANCS, los tumores colorrectales pueden seguir otra vía caracterizada por fenómenos de hipermutación, con una elevada frecuencia en el número de bases de ADN mutadas. La IMS es la vía principal en los tumores de fenotipo hipermutado.

Las mutaciones en los genes reparadores de ADN (*mismatch repair genes*, genes MMR), tales como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* producen inestabilidad en las regiones microsatélite. Los microsatélites son secuencias de nucleótidos repetitivas en tándem que existen en el ADN en condiciones normales y que son especialmente propensas a presentar mutaciones, que habitualmente son reparadas por los genes MMR. Cuando estos genes se encuentran inactivados se produce el fenómeno conocido como IMS.

Estas secuencias repetitivas son muy propensas a desalinearse o aparearse incorrectamente por causa de un fenómeno conocido como deslizamiento de las hebras (*slippage*). Como resultado de ese deslizamiento, se producen deleciones o inserciones en las secuencias microsatélite, que son eficazmente corregidas por las proteínas *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MSH3* y *MLH3*. Entre ellas forman complejos heterodiméricos, de los que en el momento actual se conocen dos tipos. El más abundante y primero en actuar, MutS α , está formado por *MSH2*-*MSH6* (en un 10% *MSH2* se une a *MSH3*). A este complejo se le une posteriormente otro, MutL α , formado por *MLH1*-*PMS2* (o alternativamente, *MLH1*-*MLH3*). El complejo final escinde el error del ADN y lo repara (Jover R y Payá A, 2003).

Si se inactivan por cualquier mecanismo ambas copias de alguno de estos genes, no se repararán los errores de replicación y se acumularán mutaciones en los microsatélites. Las alteraciones más patogénicas son las que afectan a *MLH1* y *MSH2*, ya que son insustituibles en sus respectivos complejos, y éste es el motivo de que sean los genes más frecuentemente inactivados en el síndrome de Lynch (SL). En condiciones normales, en ausencia de alteración en estas proteínas, el sistema MMR reconoce el error y produce una escisión del ADN dañado antes de su replicación (figura I-5) (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

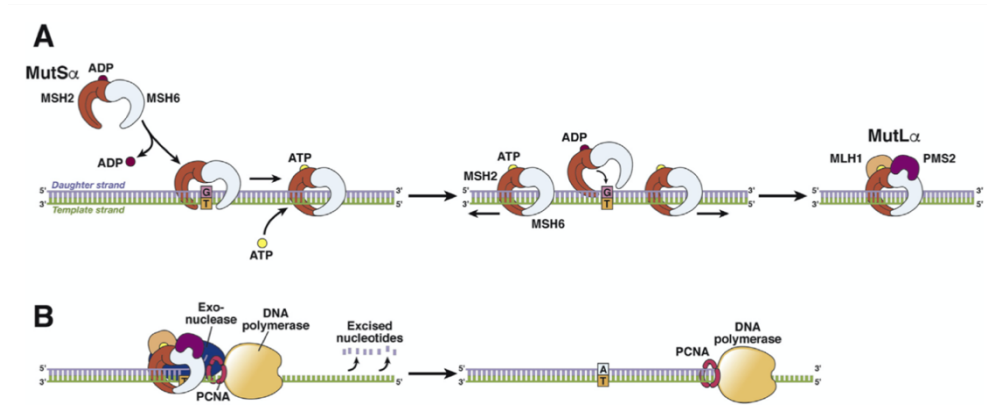


Figura I.5. Sistema de reparación de errores mediante bucles de inserción/delección. (A) Cuando se detecta un error, MSH2 se conjuga junto con MSH6 o MSH3 para formar MutS α (para corregir un error único base-base o acortar una secuencia corta de ADN dañado) o MutS β (para corregir secuencias largas de ADN dañado), respectivamente. MutS α o MutS β se unirán a MutL α , β o γ (MLH1 se complementa con PMS2, PMS1 o MLH3, respectivamente) para eliminar el nucleótido mal incorporado. (B) Esto permite que las proteínas ADN polimerasa y ADN ligasa resínteticen, incluyan y ligan la base correcta.

La IMS es una consecuencia del error que producen proteínas disfuncionales encargadas en condiciones normales del reconocimiento y reparación de errores en la replicación del ADN (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

La IMS se observa en el 15% del CCR de tipo esporádico y prácticamente en todos los casos de pacientes con SL, el síndrome de CCR hereditario más frecuente, causado por mutaciones germinales en los genes MMR (Boland CR *et al.*, 1998).

La causa más frecuente de IMS es el silenciamiento del gen *MLH1* mediante una hipermetilación de su promotor. Los tumores colorrectales con fenotipo de IMS habitualmente presentan niveles elevados de metilación en regiones reguladoras a lo largo del genoma incluyendo el fenotipo metilador de islotes de citosina/guanina (CpG). Los tumores con IMS también presentan una elevada frecuencia de mutación en el aminoácido 600 de BRAF que codifica una sustitución de V por E (BRAF^{V600E}), con una baja frecuencia de mutaciones de *APC* y *TP53* con respecto a los que se desarrollan vía IC (Giannakis M *et al.*, 2014; Rajagopalan H *et al.*, 2002). En pacientes con SL, se observan mutaciones germinales en genes MMR cuyo resultado es la IMS, pero generalmente no presentan mutaciones en *BRAF* (Bessa X *et al.*, 2008).

Las mutaciones que induce la IMS afectan, en más del 90% de los casos, al gen *TGFBR2*, el cual codifica una proteína que regula la proliferación epitelial colónica. El acúmulo de mutaciones en *TGFBR2*, sin una señal reguladora que inactive su receptor, desencadenará fenómenos de proliferación no controlados (Duval A y Hamelin R, 2002). El inicio de la carcinogénesis por la vía de la IMS puede producirse por múltiples fenómenos. Las mutaciones en *APC* se encuentran en aproximadamente el 35-50% de los tumores, lo cual supondría que el evento inicial para la formación del adenoma es común a la vía de la IC. Igualmente, otros tumores pueden iniciarse a través de la mutación en *BRAF*, lo cual compartiría fenómenos comunes con la vía serrada (figura I-4) (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020). Sin embargo, los tumores que se inician vía IMS, independientemente de su fenómeno inicial, progresan de forma más rápida que por otras vías, especialmente cuanto mayor es el nivel de inestabilidad. Los tumores con IMS presentarán tiempos de progresión tumoral menores, de aproximadamente 1-3 años, comparados con las décadas que suponen aquellos que se producen por la vía de la IC.

El nivel de IMS se determina mediante un panel estándar de marcadores de microsatélites establecido por las guías de consenso del *National Cancer Institute/Bethesda*. Los tumores con alteración en el 30% o mayor en los genes marcados serán considerados con IMS-alta (o IMS propiamente), mientras que aquellos con niveles de alteración inferiores al 30% se considerarán como bajo nivel de IMS (IMS-baja). De la misma forma, aquellos tumores que no presenten ninguna alteración en el análisis serán considerados como estables desde el punto de vista de los microsatélites (EMS) (Dietmaier W *et al.*, 1997).

A pesar de que los tumores con IMS presentan peores características histopatológicas, como un pobre nivel de diferenciación, la presencia de la IMS supone un mejor pronóstico en la evolución de la enfermedad, por lo que el análisis del nivel de estabilidad debería ser realizado de rutina en todos los pacientes con diagnóstico de CCR (Amin MB *et al.*, 2017). En el caso de tumores localizados, aquellos con IMS, presentarán mayor índice de supervivencia que aquellos con EMS (Lothe RA *et al.*, 1993; Gryfe R *et al.*, 2000).

2.2.3. Vía serrada o fenotipo metilador

Los adenomas no son las únicas lesiones colónicas precursoras de neoplasias colorrectales. Los pólipos serrados son lesiones mucosas, en forma de dientes de sierra, que pueden presentar un amplio espectro de alteraciones histopatológicas. Se estima que aproximadamente el 15% del CCR asienta sobre un pólipo serrado como lesión precursora, desarrollándose a través de la vía serrada (Toyota M *et al.*, 1999).

Los pólipos serrados se engloban dentro de un grupo heterogéneo de lesiones que presenta un patrón de aspecto estrellado debido al plegamiento de las criptas colónicas, incluyendo en este grupo de lesiones pólipos hiperplásicos benignos, adenomas o pólipos sésiles serrados precancerosos y adenomas serrados tradicionales (Bosman GT *et al.*, 2010). Una elevada proporción de los tumores colorrectales de intervalo (aquellos que se desarrollan antes del periodo establecido de carcinogénesis habitual de 3 a 5 años) se estima que se desarrollan a partir de la vía serrada (Nishihara R *et al.*, 2013; Burgess NG *et al.*, 2014).

Los pólipos hiperplásicos suponen el 60% de las lesiones serradas y raramente sufren una transformación maligna en su evolución, siendo las segundas lesiones serradas más frecuentes los pólipos y adenomas sésiles serrados. Se trata de lesiones de difícil caracterización debido a la morfología plana o serrada, lo cual supone un reto diagnóstico en ausencia de cromoendoscopia, incluso para endoscopistas expertos, así como la presencia de rasgos histopatológicos sutiles y difíciles de diferenciar a nivel anatomopatológico (Higuchi T, Sugihara K y Jass JR, 2005). Los adenomas serrados tradicionales suponen una pequeña proporción de las lesiones serradas y se caracterizan histopatológicamente por un crecimiento protuberante con prolongaciones viliformes, lo cual puede suponer confusión con respecto a los adenomas tubulovillosos. La progresión tumoral a través de la vía serrada no se encuentra totalmente caracterizada, aunque aquellos tumores serrados que adquieren IMS se asocian con una progresión tumoral acelerada desde lesiones precancerosas a carcinoma, similar a aquellos tumores con IMS exclusivamente. Un rasgo distinguible de la vía serrada es la activación de la mutación V600E en *BRAF* (Davies H *et al.*, 2002). Una elevada proporción de los pólipos hiperplásicos presentan mutación en *BRAF*, por lo que se cree que este fenómeno supone una de las etapas iniciales en la vía serrada, causando la activación de la vía de la proteinquinasa-ERK y, por tanto, el inicio de una

división celular descontrolada (Davies H *et al.*, 2002; Boland CR *et al.*, 1998). *BRAF* se encuentra mutado en la mayoría de los adenomas serrados sésiles, pero no en los adenomas convencionales, lo cual apoya la teoría de que la vía serrada es una vía alternativa de carcinogénesis colorrectal (Kambara T *et al.*, 2004).

Tras la mutación en *BRAF*, los tumores serrados pueden seguir dos rutas diferentes (figura I-4) (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020). Una de ellas converge con la vía de la IMS: la mutación en los genes MMR resultará en un fenotipo de IMS. Estos tumores típicamente se desarrollan a partir de adenomas serrados sésiles y comparten características con el grupo de tumores del SCM1. La otra ruta que pueden seguir los tumores serrados tras la mutación en *BRAF* se produce a través de la mutación en *TP53*, con posibilidad de activación posterior de la señalización de Wnt, la señalización de *TGF β* y la activación de la transición epitelial a mesenquimal, resultando en tumores no hipermutados o con EMS (figura I-4) (Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020). Estos tumores suelen desarrollarse a partir de adenomas serrados tradicionales y se engloban dentro del grupo de tumores del SCM4, los cuales presentarán, a diferencia de los tumores SCM1, bajos niveles de hipermutación, EMS con IC y elevada ANCS.

Los tumores del SCM4 producen activación de vías que facilitan un ambiente inmunosupresor y permiten fenómenos de inflamación estromal e invasión tumoral, evadiendo la respuesta inmune y resultando en el peor índice de supervivencia de todos los SCM (Sinicrope FA *et al.*, 2017; Blaker H *et al.*, 2019). Comparado con los tumores que se desarrollan a través de la IC (caracterizados por EMS y ausencia de mutación en *BRAF*), los tumores con EMS y mutación en *BRAF* presentarán peor supervivencia global y peor supervivencia relacionada con la enfermedad a diferencia de los tumores con IMS y mutación en *BRAF*, los cuales presentan las mejores supervivencias de todos los grupos tumorales (Blaker H *et al.*, 2019).

A diferencia de la buena respuesta a la monoterapia con inhibidores de *BRAF* en otros tipos de tumores que también presentan mutación de *BRAF*, como el melanoma, no existe consenso acerca de su uso en el caso del CCR (Hyman DM *et al.*, 2015). Esto es debido al frecuente desarrollo de mutaciones compensatorias a través de otras vías, como la regulada por *EGFR*. Recientemente, se ha incluido en el arsenal terapéutico la combinación en politerapia de inhibidores de *BRAF* e inhibidores de MEK y EGFR, con

resultados prometedores y actualmente recomendada en las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (Benson AB *et al.*, 2018).

Los tumores que se desarrollan por la vía serrada habitualmente presentan un elevado nivel de metilación de los islotes de CpG. Los islotes de CpG son regiones densas compuestas por dinucleótidos de citosina/guanina, enlazados por fosfatos, que son especialmente predominantes en regiones promotoras de genes a lo largo del ADN (Bird AP *et al.*, 1986). La hipermetilación de estos islotes promotores, especialmente aquellos precursores de genes supresores de tumores, anulará su transcripción y, por tanto, facilitará el desarrollo tumoral. Los mecanismos moleculares que subyacen en este fenotipo metilador de islotes de CpG (CIMP, *CpG Island Methylator Phenotype*) no se encuentran claramente establecidos en la actualidad. Inicialmente, los tumores incluidos en este espectro se clasificaron como CIMP-alto (≥ 3) y CIMP-bajo (< 2) en función del número de marcadores de metilación encontrados en 5 genes: *MINT1*, *MINT2*, *MINT31*, *CDKN2A* y *hMLH1* (Chan AO-O *et al.*, 2002). En la actualidad, se han propuesto varios paneles de genes más, incluso es posible cuantificar el estado de hipermetilación a lo largo de todo el genoma.

Independientemente de su clasificación, los tumores incluidos dentro del espectro del CIMP-alto suponen aproximadamente el 20% de los tumores colorrectales y suelen asociarse con mutación en *BRAF* e hipermetilación en *MLH1*, características compartidas con los tumores con IMS (Chan AO-O *et al.*, 2002). A pesar de que el CIMP se puede observar en muchos tumores esporádicos con IMS, su presencia no solo se restringe a los tumores con IMS, ya que aproximadamente la mitad de los tumores con CIMP no presentarán metilación en *MLH1* o IMS (Samowitz WS *et al.*, 2005).

La presencia de metilación en los islotes de CpG puede observarse desde etapas tempranas de la carcinogénesis, incluso en lesiones benignas como pólipos hiperplásicos y su frecuencia aumenta según evoluciona hacia lesiones más avanzadas. Igualmente, se ha evidenciado una asociación entre la presencia del CIMP en tejido sano y la posterior formación de pólipos serrados (Worthley DL *et al.*, 2010). Diferentes metaanálisis sugieren que el CIMP se correlaciona con la presencia de tumores mucinosos o poco diferenciados, habitualmente con mutaciones en *BRAF* e IMS, con predominio del colon derecho y en pacientes mujeres de edad avanzada (Advani SM *et al.*, 2018; Zong L *et al.*, 2016).

2.3. Características moleculares del CCR en jóvenes y comparativo con el CCR de aparición tardía

Clásicamente, el estudio del CCRJ se ha realizado en base al despistaje del SL, el cual se estima entre el 4 y el 19%, según las series (Pearlman R *et al.*, 2017). No obstante, la proporción de los pacientes jóvenes con IMS relacionada y no relacionada con SL se estima hasta en un 40%, dependiendo de la edad de diagnóstico (Farrington SM *et al.*, 1998; Silla IO *et al.*, 2014).

A pesar de la elevada frecuencia de síndromes hereditarios y agregación familiar en el CCRJ, existe una elevada proporción de pacientes jóvenes con características clínicas y moleculares que sugieren tumores esporádicos. Si bien la patogénesis del CCRJ asociada a síndromes hereditarios se encuentra relativamente estudiada, el conocimiento de las características moleculares de los tumores esporádicos en este grupo de edad aún es limitado. No obstante, desde el inicio del estudio de este subtipo de pacientes se ha evidenciado que, comparándolo con el CCRAT, se trata de una entidad diferente desde el punto de vista molecular.

Como se ha comentado previamente, el CCRJ con IMS fundamentalmente se encuentra asociado con el SL debido a la mutación germinal en genes MMR, siendo aquellos casos con mutación en *BRAF* y, por lo tanto, esporádicos, prácticamente ausentes comparados con el CCRAT (Perea J *et al.*, 2014; Kirzin S *et al.*, 2014). Los tumores con IMS a edad avanzada se asocian frecuentemente con inactivación de *MLH1* (83%) y metilación del promotor de *MLH1* (62%) (Yiu R *et al.*, 2005).

No obstante, la mayoría del CCRJ no mostrará IMS, siendo estable desde el punto de vista de los microsatélites y con ausencia de alteración en genes MMR (figura I-6A) (Ballester V, Rashtak S y Boardman L, 2016). Estos tumores se caracterizan por diagnosticarse a edades más avanzadas dentro del grupo de jóvenes, con localizaciones distales dentro del colon, estadios más avanzados y patrones histológicos agresivos (Chang DT *et al.*, 2012). Estas características son claramente diferenciales respecto al grupo de tumores con EMS dentro del CCRAT, el cual presenta predominio de localización en colon derecho, con menor prevalencia de tumores sincrónicos y metacrónicos en su evolución (figura I-6B).

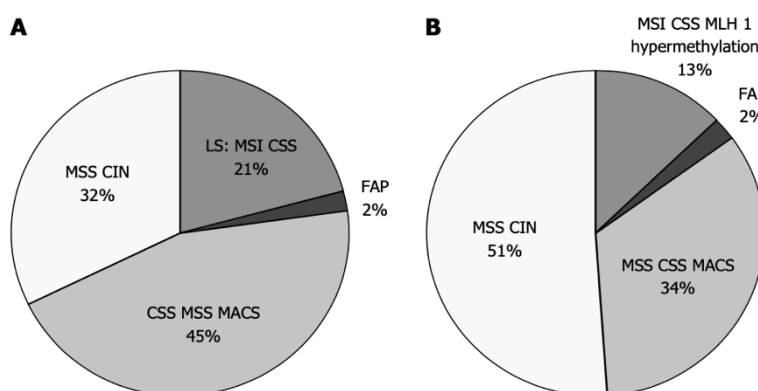


Figura I.6. Características moleculares del CCRJ (figura I-6A) y del CCRAT (figura I-6B) (Ballester V, Rashtak S y Boardman L, 2016).

En cuanto al fenotipo metilador, múltiples estudios comparativos han mostrado el papel menor de esta vía comparado con el CCRAT o el CCR primario múltiple. En general, los tumores con CIMP-alto se caracterizan por desarrollarse en localizaciones proximales en el colon, suelen ser pobremente diferenciados, con IMS y con mutaciones en *BRAF* (Silla IO *et al.*, 2014). Los pacientes jóvenes suelen presentar CIMP-bajo, no obstante, los casos asociados a SL presentarán mayor proporción de CIMP-alto respecto a los pacientes con SL que desarrollan CCRAT. En la misma línea, en el grupo del CCRJ, el CIMP-alto se encuentra asociado fundamentalmente con alteración en los genes MMR, mientras que el CIMP-alto en el grupo de CCRAT se caracteriza por IMS de tipo esporádico (Perea J *et al.*, 2014). Los pacientes jóvenes con tumores desarrollados a partir de esta vía presentarán predominio de localización en el colon izquierdo, elevada frecuencia de CIMP-bajo, así como una mayor historia familiar de cáncer a expensas de neoplasias relacionadas con SL, pero también de tumores no relacionados con SL (Perea J *et al.*, 2014).

Por último, la hipometilación en *LINE-1* es una característica diferencial del CCRJ y se asocia con un incremento de la IC (Antelo M *et al.*, 2012). El grado de hipometilación de *LINE-1* se ha establecido como un factor independiente de riesgo de muerte por cáncer y mortalidad global en pacientes con CCR (Ogino S *et al.*, 2008). Estudios recientes han demostrado que, comparado con el grupo de CCRAT, el CCRJ presenta niveles significativamente menores de metilación en *LINE-1*, aunque serán necesarios estudios adicionales para corroborar la asociación y el valor pronóstico de *LINE-1* en el CCRJ (Antelo M *et al.*, 2012).

3. Factores de riesgo

3.1. Factores de riesgo modificables y no modificables

Tanto los factores genéticos como los ambientales juegan un papel fundamental en la etiología del CCR. La mayoría de los tumores son esporádicos, únicamente un 15-20% de los pacientes presentan historia familiar de CCR.

Uno de los principales factores de riesgo es el de los síndromes hereditarios predisponentes a CCR, los cuales suponen entre el 5 y el 15% del total de pacientes y cuyas características, diagnóstico y manejo se discutirán más adelante. Otro de los factores de riesgo para el desarrollo de CCR es la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). El riesgo de cáncer en pacientes con EII es directamente proporcional al tiempo de evolución de la enfermedad, si bien ésta supone únicamente el 1% de todos los diagnósticos de CCR y varios estudios sugieren que los actuales fármacos antiinflamatorios están disminuyendo esta incidencia (Jess T *et al.*, 2012).

El otro grupo destacado de factores de riesgo es el de los que pueden considerarse modificables, ya que es debido a factores ambientales y, en su mayor proporción, a estilos de vida. Entre los factores más destacados podemos encontrar el hábito tabáquico, el alcohol y el sobrepeso. Con cada unidad de aumento de índice de masa corporal (IMC) el riesgo de CCR aumenta un 2-3% (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2011) y, en parte relacionada con la obesidad, la presencia de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) también se correlaciona con un aumento de riesgo de cáncer (Guraya SY *et al.*, 2015). El consumo moderado de alcohol (2-3 unidades/día) se estima que induce un aumento del riesgo de cáncer del 20-30%, mientras que el consumo elevado de alcohol aumenta este riesgo hasta en un 50% (Fedirko V *et al.*, 2011). El hábito tabáquico induce un riesgo similar que el alcohol y éste es directamente proporcional al número de paquetes/año (Liang PS, Chen TY y Giovannucci E, 2009).

En cuanto a la dieta, uno de los factores de riesgo más influyentes es el consumo de carne roja y carnes procesadas, de forma que un consumo 1,16 veces de 100 g/día

es suficiente para aumentar el riesgo de CCR (Song M *et al.*, 2015). En contraste, el consumo de leche, fibra, frutas y verduras, cereales integrales, calcio y vitamina D, supone un factor protector frente al CCR. Esta disminución del riesgo se estima entorno al 10% por cada ingesta diaria de 10 g de fibra, 300 mg de calcio o 200 ml de leche (Song M *et al.*, 2015; Dahm CC *et al.*, 2010). De la misma manera, la realización de actividad física al menos 30 min al día también influye positivamente en la disminución del riesgo de CCR (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2011). La ingesta diaria de bajas dosis de aspirina y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos también se han relacionado con una disminución del riesgo de CCR (Algra AM y Rothwell PM, 2012), así como el uso de estatinas y la terapia hormonal en mujeres postmenopáusicas (Bardou M, Barkun A y Martel M, 2010; Limsui D *et al.*, 2012).

La prevalencia de estos factores de riesgo modificables puede explicar, en parte, las diferencias en la incidencia global del CCR desde el punto de vista geográfico y socioeconómico. Múltiples estudios sugieren que entre el 16 y el 71% del total de pacientes con CCR en Europa y Estados Unidos puede ser atribuido a estilos de vida modificables (Aleksandrova K *et al.*, 2014). La gran cantidad de factores ambientales y genéticos que pueden influir en el desarrollo del CCR también explica la heterogeneidad de esta enfermedad, así como parte de su fisiopatología, desde las alteraciones moleculares que dan lugar al desarrollo de células tumorales, hasta la progresión de la enfermedad (figura I-7) (Dekker E *et al.*, 2019).

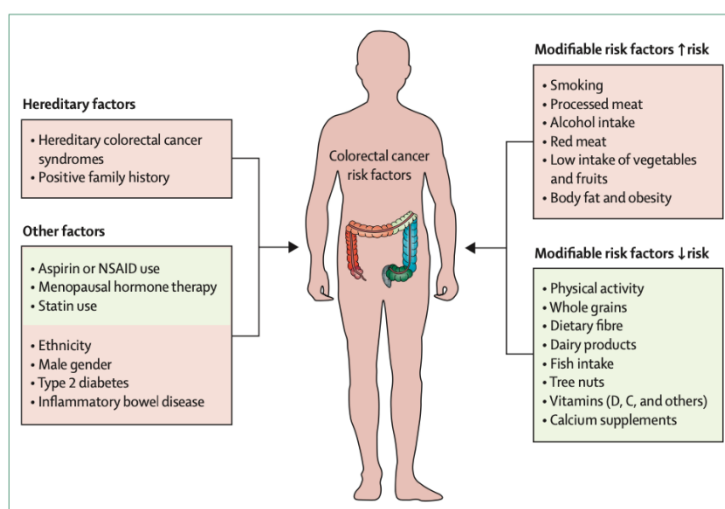


Figura I.7. Factores de riesgo de CCR modificables y no modificables.

*Rojo: factores que aumentan el riesgo de CCR. Verde: factores que disminuyen el riesgo de CCR. NSAID: antiinflamatorios no esteroideos (Dekker E *et al.*, 2019).*

3.2. Microbioma

El microbioma es el responsable de la homeostasis intestinal a través de múltiples mecanismos y su alteración (disbiosis) es la responsable de múltiples patologías, no solo gastrointestinales, sino respiratorias, cardiovasculares, autoinmunes y metabólicas (como la DM2). En los últimos años se ha demostrado la creciente interconexión entre el microbioma, el CCR, la obesidad y la DM2, con especial relevancia en el caso del CCRJ (Gao Z *et al.*, 2015).

El papel de algunos microorganismos en el proceso de carcinogénesis colorrectal es bien conocido, fundamentalmente a expensas de fenómenos de inflamación y alteración de la respuesta inmune. Algunos de los microorganismos más conocidos son el *Streptococcus bovis*, algunos tipos de fusobacteria (especialmente *Fusobacterium nucleatum*), *Bacteroides fragilis* y algunos subgrupos de *Escherichia coli* y *Enterococcus* (como *Klebsiella* o *Peptoestreptococcus*) (Hernandez- Luna MA, Lopez-Briones S y Luria-Perez R, 2019). El papel del microbioma en la carcinogénesis también puede estar relacionado con fenómenos de desequilibrio de la homeostasis intestinal y disbiosis, más que por un microorganismo en concreto, dichos cambios en parte influidos, a su vez, por factores ambientales y dietéticos. Igualmente, se ha evidenciado que existe asociación entre algunas bacterias y ciertos fenotipos moleculares de CCR, como la IMS o el CIMP, así como la relación con la afectación metastásica ganglionar, lo cual supone un peor pronóstico e incluso en algunos pacientes, resistencia a fármacos quimioterápicos (Gao R *et al.*, 2017).

En los últimos años se han evidenciado importantes alteraciones en el microbioma intestinal relacionadas con la obesidad y la DM2 (Aydin O, Nieuwdorp M y Gerdes V, 2018), señalando que la disbiosis se correlaciona con la obesidad y la resistencia a la insulina, así como con cierta actividad proinflamatoria intestinal. Este estado proinflamatorio intestinal puede favorecer cambios en la producción de las endotoxinas bacterianas, especialmente en el caso de las bacterias *Gram* negativas, lo cual puede inducir fenómenos de translocación bacteriana y paso de las mismas al sistema circulatorio. Esta translocación bacteriana también podría influir en la estimulación de cierta actividad proinflamatoria en el tejido adiposo, la cual puede constituir el nexo con la obesidad y la resistencia a la insulina.

Por otra parte, se ha observado la disminución de ciertas bacterias con actividad antiinflamatoria como *Faecalibacterium prausnitzii* (Martín R *et al.*, 2007) en muestras de heces de sujetos con DM2, lo cual puede favorecer el incremento de este estado proinflamatorio intestinal y, por tanto, la carcinogénesis colorrectal.

4. Fisiopatología

La pérdida de la estabilidad genética y/o epigenética se puede observar en la mayoría de las lesiones preneoplásicas del colon y parece ser el evento central precursor del resto de fenómenos moleculares y fisiopatológicos de iniciación y establecimiento del CCR (Colussi D *et al.*, 2013). La inestabilidad genética y epigenética acelera la acumulación de mutaciones y errores en genes supresores de tumores y oncogenes, los cuales favorecerán la transformación de células epiteliales normales a células malignas con expansión clonal agresiva (Fearon ER y Vogelstein B, 1990).

Esta evolución desde un epitelio colónico normal hasta la consolidación tumoral sigue una serie de procesos con acumulación de eventos moleculares, genéticos y epigenéticos, cuyo resultado final será el desarrollo y mantenimiento del CCR, siguiendo las vías principales de carcinogénesis, como se ha detallado previamente (figura I-8):

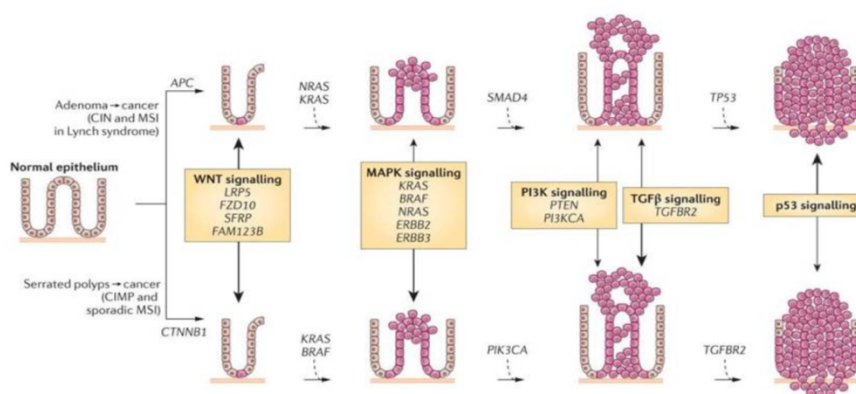


Figura I.8. Secuencia pólipos-adenocarcinoma. Superior: secuencia clásica de pólipo-adenoma-adenocarcinoma. Inferior: secuencia alternativa mediada por pólipos serrados. Los genes mutados y la acumulación de alteraciones epigenéticas se describen en cada secuencia, algunos genes se encuentran en ambas secuencias, mientras que otros son específicos de cada vía (por ejemplo, la mutación en *BRAF* y el CIMP que son específicas de la vía serrada).

CIN, inestabilidad cromosómica (IC); *MSI*, inestabilidad de microsatélites (IMS); *CIMP*, fenotipo metilador de islotes de CpG (CIMP) (Dekker E *et al.*, 2019).

En el modelo de carcinogénesis colorrectal clásico, la mayoría de los tumores colorrectales derivan de un pólipo benigno sobre el que aparece una cripta aberrante que desembocará en la formación de un adenoma temprano (< 1 cm, con histología de tubular o tubulovelloso) y, posteriormente, un adenoma avanzado (> 1 cm y/o con histología de velloso), convirtiéndose definitivamente en tumoral. Este proceso se encuentra mediado por la acumulación de mutaciones y alteraciones epigenéticas, con un tiempo de evolución aproximado de 10-15 años, salvo excepciones como en el caso de los pacientes con SL (Jones S *et al.*, 2008). Aunque la histología de estas lesiones precursoras de cáncer suele ser homogénea, la biología molecular de los adenomas es heterogénea, lo que explica por qué algunos adenomas evolucionan a cáncer (aproximadamente el 10%) y otros no (Luo Y *et al.*, 2014).

Aparte del modelo de carcinogénesis clásico de pólipo-adenoma-adenocarcinoma, en los últimos años se ha descrito otro modelo cuya lesión precursora no es un adenoma, sino un pólipo serrado, los cuales representan el 5-10% de todos los pólipos colorrectales. Estos pólipos se desarrollan a partir de alteraciones histológicas y moleculares diferentes y se pueden subclasificar en tres tipos: pólipos hiperplásicos, adenomas sésiles serrados y adenomas serrados clásicos (Rex DK *et al.*, 2012). El potencial de transformación de los pólipos serrados a CCR se establece a través de la secuencia: pólipo hiperplásico-pólipo sésil serrado-adenocarcinoma (Goldstein NS, 2006). En cuanto a la biología molecular de este grupo de tumores, los pólipos serrados que asientan sobre el colon derecho normalmente mostrarán IMS, así como predominio del CIMP; mientras que los pólipos que asientan en el colon izquierdo y recto presentarán predominio de EMS y mutación en *KRAS* con formas atenuadas de CIMP en algunos casos (Bettington M *et al.*, 2013).

Estas diferencias moleculares objetivadas entre los diferentes pólipos y tumores colorrectales son el motivo para el desarrollo del sistema de subclasificación del CCR, tal y como se ha detallado previamente (figura I-4), en cuatro grupos de tumores: hipermutados-IMS, hipermutados-EMS, EMS o IC y CIMP (The Cancer Genome Atlas Network, 2012; Nguyen LN, Goel A y Chung DC, 2020).

5. Diagnóstico del CCR. *Screening* y sistemas de detección precoz

En cuanto al diagnóstico del CCR podemos diferenciar dos tipos de pacientes: aquellos en los que el diagnóstico se realiza tras consultar por presentar sintomatología relacionada con el tumor y los pacientes en los que el diagnóstico se realiza a través de programas de *screening* específicos, cada vez más implementados en los sistemas de salud.

5.1. Clínica

Los pacientes con CCR pueden debutar con un gran espectro de signos y síntomas, incluyendo sangre en las heces, cambios en el ritmo intestinal, dolor abdominal, anemia, anorexia o pérdida de peso. Si bien, muchos pacientes permanecerán asintomáticos hasta etapas avanzadas.

La sintomatología también dependerá de la localización del tumor. Los tumores de colon derecho e izquierdo suelen cursar con hematoquecia o sangrado oculto en heces, por lo que en muchas ocasiones el paciente únicamente debutará con anemia o fatiga. Aproximadamente el 30% de los pacientes con CCR debutarán con síntomas obstructivos (Smothers L *et al.*, 2003). En el caso del cáncer de recto las manifestaciones clínicas también son múltiples, si bien es más frecuente el sangrado, dolor y tenesmo. El 20% de los pacientes con cáncer de colon y el 18% de los pacientes con cáncer de recto debutarán con metástasis al diagnóstico, siendo el hígado la localización más frecuente, seguida del pulmón (Duffy MJ *et al.*, 2003).

El valor predictivo de estos síntomas en pacientes de edad avanzada es limitado, no obstante, la Asociación Americana de Gastroenterología Endoscópica recomienda la realización de una sigmoidoscopia flexible en los pacientes menores de 40 años con sangrado rectal de nueva aparición, con realización de colonoscopia completa en los mayores de 40 años (Pasha SF *et al.*, 2014). Dada la creciente incidencia del CCR esporádico entre individuos jóvenes y su escasa inclusión en los sistemas de *screening* actuales, es necesaria una elevada sospecha clínica ante cualquier síntoma relacionado o historia familiar de cáncer en este grupo de edad.

5.2. Estudios de laboratorio

En ocasiones la presencia de anemia microcítica en los estudios de laboratorio es la única manifestación clínica de CCR, por lo que en cualquier paciente con sospecha o diagnóstico de CCR será necesaria la realización de un estudio analítico completo.

En el caso de confirmación de CCR conviene también realizar la determinación del **antígeno carcinoembrionario (CEA)**. La determinación del CEA no puede utilizarse como prueba diagnóstica o de *screening* debido a la baja sensibilidad en estadios iniciales y porque existen múltiples condiciones benignas que pueden elevar este marcador. No obstante, sí parece observarse cierto valor pronóstico en los casos confirmados de CCR (a mayor concentración inicial mayor riesgo de recidiva postoperatoria y en un periodo más breve) y es utilizado para la monitorización postquirúrgica o de los pacientes en tratamiento adyuvante, ya que su valor debe normalizarse entre 1 y 4 meses después de la resección completa del tumor (Duffy MJ *et al.*, 2003).

El **test de sangre oculta en heces (TSOH)** y el **test de inmuistoquímica fecal (TIF)** son pruebas diagnósticas de CCR encaminadas a la identificación de hemoglobina como marcador de pérdidas sanguíneas digestivas en relación con neoplasias. El TSOH es capaz de detectar la actividad peroxidasa del grupo heme, por lo que no es específico para sangre humana, mientras que el TIF utiliza anticuerpos globina humanos para determinar hemoglobina, por lo que es específico para determinar sangre humana (Lieberman DA, 2009). La sensibilidad del TIF si se compara con la colonoscopia para detectar CCR y lesiones preneoplásicas avanzadas es del 60-85% y 29% respectivamente, menor que en el caso del TSOH que se sitúa en torno al 33-75% y el 11-25%, respectivamente (Lee JK *et al.*, 2014). Sin embargo, la especificidad del TSOH se sitúa en torno al 98-99%, mayor que en el caso del TIF, entre el 94-95% (Lieberman DA, 2009). El TSOH ha demostrado reducir la mortalidad por CCR entre un 15 y un 33% cuando se utiliza como método de *screening* de forma anual (Kronborg O *et al.*, 1996; Hardcastle JD *et al.*, 1996).

La ventaja de ambos test es que no son invasivos, se pueden realizar en el domicilio y no precisan preparación intestinal. Entre sus limitaciones cabe destacar que

sus resultados pueden verse alterados en caso de lesiones que sangren de forma esporádica o lesiones preneoplásicas poco avanzadas en las que el riesgo de sangrado es menor, detectando únicamente lesiones en estadios avanzados. La ingesta de vitamina C puede alterar la actividad peroxidasa generando falsos negativos, así como la hemoglobina procedente de carne roja puede generar falsos positivos, en el caso del TSOH (Stracci F, Zorzi M y Grazzini G, 2014).

En cualquier caso, la positividad en alguno de estos test obliga a la realización de estudios endoscópicos para descartar el diagnóstico de CCR.

5.3. Estudios endoscópicos

La **colonoscopia** es la prueba *gold standard* para el diagnóstico del CCR. Se trata de una prueba con gran eficacia diagnóstica que, además de localizar la lesión tumoral, permite la toma de biopsia y, en algunos casos, la realización de terapéutica (Kekelidze M *et al.*, 2013). También es la prueba fundamental en el *screening* del CCR permitiendo la extirpación de lesiones preneoplásicas con la consiguiente disminución de la incidencia de cáncer y mortalidad asociada al mismo, que en algunas series se estima en un 70 y 30%, respectivamente (Valori R *et al.*, 2012).

La sensibilidad de la colonoscopia para detectar lesiones neoplásicas es superior al 95%, con una sensibilidad para la detección de lesiones preneoplásicas avanzadas (aquellas con un diámetro ≥ 10 mm) de aproximadamente el 88-98% (Rockey DC *et al.*, 2005). La calidad de la colonoscopia también es un factor determinante para evitar lesiones de intervalo (aquellas que se desarrollan entre dos pruebas de *screening* consecutivas).

Una de las principales ventajas de la colonoscopia es la posibilidad de extirpar lesiones preneoplásicas y neoplásicas poco avanzadas en el mismo acto diagnóstico (figuras I-10 y I-11). En cuanto a las limitaciones, es necesario destacar que se trata de un procedimiento invasivo, que requiere preparación intestinal y sedación o anestesia durante el procedimiento, incluyendo la morbilidad asociada a la modificación de determinados fármacos para la realización de la prueba. Igualmente, cabe destacar el riesgo de perforación colónica y sangrado durante el procedimiento, mayor en el caso

de realización de terapéutica endoscópica avanzada (Cooper GS, Kou TD y Rex DK, 2013).

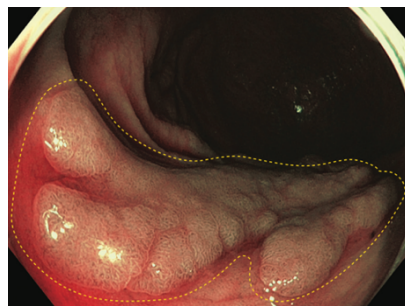


Figura I.9. Imagen de colonoscopia de pólipo colónico plano. La línea amarilla hace referencia al margen de resección endoscópica (Dekker E *et al.*, 2019).

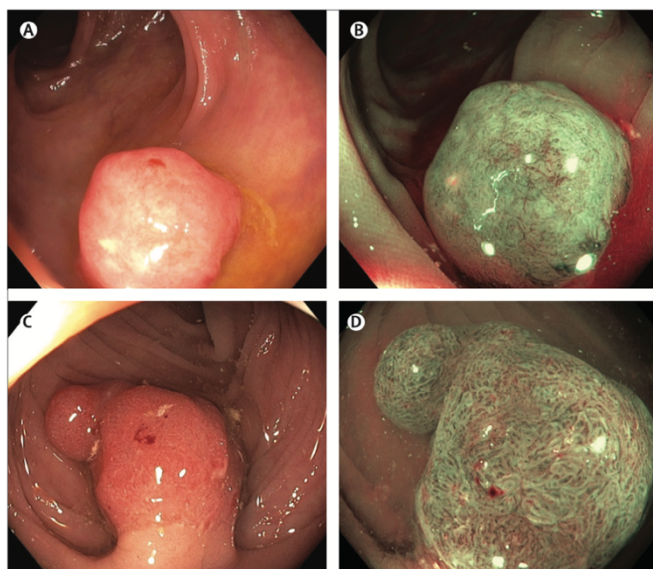


Figura I.10. Imágenes de colonoscopia de pólipos pediculados. Las imágenes B y D muestran pólipos teñidos para su mejor caracterización y extirpación endoscópica (Dekker E *et al.*, 2019).

La **sigmoidoscopia flexible** es un procedimiento endoscópico menos común para el diagnóstico del CCR. Se trata del estudio endoscópico del segmento distal del colon, sin necesidad de sedación o anestesia ni preparación mecánica intestinal. Tiene una sensibilidad mayor del 95% para detectar lesiones neoplásicas en el segmento explorado y de aproximadamente el 70% para lesiones preneoplásicas avanzadas (Levin B *et al.*, 2008). En el caso de que se detecten lesiones sospechosas en el segmento explorado, será necesaria la realización de una colonoscopia completa para estudio de todo el marco cólico.

La sigmoidoscopia flexible permite, igual que la colonoscopia, el diagnóstico y realización de terapéutica en el segmento explorado, si bien presenta las mismas limitaciones que la colonoscopia añadiendo el posible discomfort que puede generar la falta de sedación y la ausencia de estudio del segmento proximal del colon, por lo que debería ser realizada en casos puntuales de pacientes con elevada morbilidad relacionada con la sedación y aquellos con baja sospecha de lesiones neoplásicas (Levin B *et al.*, 2008).

5.4. Estudios de imagen

La **tomografía computerizada virtual (TC virtual) o TC-colonografía** es una prueba diagnóstica de imagen en la que se utiliza una preparación colónica consistente en un contraste radiológico para obtener secuencias de TC con bajas dosis de radiación, lo que permite la caracterización de lesiones colónicas intraluminales. Estudios recientes reportan una sensibilidad de hasta el 96% para el diagnóstico de CCR, siendo variable según los centros y claramente inferior a la colonoscopia en el caso de lesiones preneoplásicas (Pickhardt PJ *et al.*, 2011).

La TC virtual necesita, igual que la colonoscopia, la realización de una preparación intestinal, insuflación colónica y cambios posicionales del paciente durante la prueba, con la ventaja de no precisar sedación para su realización. La principal limitación es que no es posible la toma de biopsia ni la realización de terapéutica, por lo que, en el caso de lesiones sospechosas, será necesario completar el estudio con una colonoscopia completa. En la actualidad, el uso de esta prueba se encuentra restringido a los casos en los que no es posible una exploración completa del colon, ya sea por lesiones estenóticas, alteraciones anatómicas o mala tolerancia del paciente a la prueba (Pickhardt PJ *et al.*, 2011).

Aparte de la utilidad de la TC virtual en el diagnóstico del CCR, la realización de una **TC convencional** será fundamental en el caso de confirmación de lesiones neoplásicas o cuando exista duda diagnóstica en los estudios endoscópicos, en ausencia de TC virtual. La realización de una TC de tórax, abdomen y pelvis es esencial para la estadificación locorregional y a distancia del CCR tras su diagnóstico, así como

para el seguimiento de los pacientes durante y tras el tratamiento. La sensibilidad y especificidad de la prueba se estima en un 75 y 95%, respectivamente, en el caso de las lesiones hepáticas (Floriani I *et al.*, 2010), siendo menor en la detección de metástasis ganglionares locorregionales.

La **resonancia magnética (RM)** es otra de las pruebas de imagen esenciales en el estudio del CCR, la cual es especialmente útil en dos circunstancias concretas: para el estudio de lesiones hepáticas sospechosas y para la estadificación del cáncer de recto. En el caso de lesiones hepáticas sospechosas, la RM tiene una sensibilidad y especificidad del 88 y 97%, respectivamente, en lesiones menores de 1 cm, por lo que se trata de un estudio fundamental cuando existan lesiones hepáticas dudosas por su pequeño tamaño o localización en la TC (Niekel MC, Bipat S y Stoker J, 2010).

En el caso del cáncer de recto, la RM también es una prueba fundamental para determinar la extensión local de la enfermedad, la afectación de la fascia mesorrectal, el margen circunferencial de resección y la relación con el complejo esfinteriano (Schmoll HJ *et al.*, 2012). La RM, además, es la prueba de imagen que mejor identifica la presencia de afectación ganglionar rectal, con una sensibilidad y especificidad del 85 y 97%, respectivamente, con buena definición no solo del tamaño ganglionar, sino de la regularidad de los bordes y la heterogeneidad. Por todo esto, junto con la ecografía endorrectal, es una de las pruebas esenciales para la estadificación locorregional y la indicación de tratamiento preoperatorio, así como la radicalidad de la cirugía (figura I-12):

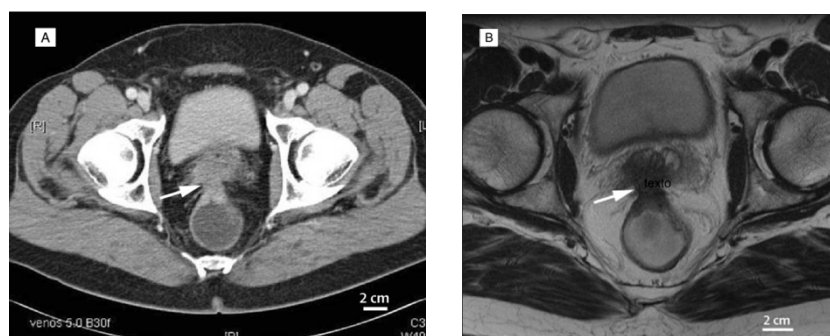


Figura I.11. Imagen de una neoplasia de recto avanzada con infiltración prostática (uT4N0) visualizada por TC (imagen A) y por RM (imagen B). En ambos casos, la flecha hace referencia a la infiltración prostática (Weitz J, Koch M y Debus J, 2005).

En cuanto a la **ecografía endorrectal**, se trata de otra de las pruebas de imagen fundamentales en la estadificación del cáncer de recto, siendo la prueba de imagen con mayor sensibilidad (aproximadamente un 97%) para la caracterización de la pared rectal y la extensión tumoral a través de esta, siendo la prueba de imagen más sensible en el caso de lesiones T1 y T2 de la clasificación TNM. También es útil para la visualización de adenopatías sospechosas perirrectales, si bien su sensibilidad es menor en comparación con la RM o la TC (Swartling T *et al.*, 2013) (figura I-13):

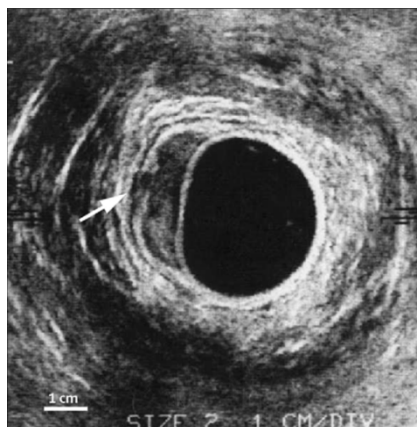


Figura I.12. Imagen de una neoplasia de recto por ecografía endorrectal. La flecha indica la infiltración de la capa muscular propia (uT2N0) (Weitz J, Koch M y Debus J, 2005).

Por último, la **tomografía por emisión de positrones (PET)** es una prueba que puede ser útil en el diagnóstico de recurrencias o enfermedad metastásica, si bien tiene un escaso papel en el diagnóstico primario del CCR.

5.5. *Screening* en el CCR

El CCR es uno de los tumores malignos más favorables para los programas de *screening*, por varios motivos: la incidencia del CCR se encuentra en aumento, especialmente a expensas de la población más joven, siendo una enfermedad con altas expectativas de curación en estadios iniciales pero con pobres resultados en etapas avanzadas y necesidad de tratamientos altamente costosos para el sistema de salud (Kuipers EJ, 2014); en la mayoría de los pacientes con tumores esporádicos (no hereditarios), se trata de una enfermedad con una etapa preclínica amplia, con un periodo de progresión de adenoma a adenocarcinoma entre 5 y 10 años; en el caso de

lesiones premalignas y estadios iniciales de cáncer, el tratamiento se puede realizar de forma poco invasiva, muchas veces en el mismo acto endoscópico diagnóstico; por último, muchos pacientes no presentarán sintomatología relacionada con el CCR hasta etapas avanzadas de la enfermedad y, con escasas expectativas de curación.

5.5.1. Métodos de *screening*

El mejor método para el *screening* del CCR es la colonoscopia. A pesar de ser un método invasivo, permite el diagnóstico y la confirmación histológica, así como la realización de terapéutica en caso de lesiones premalignas y etapas iniciales de cáncer, con una elevada sensibilidad y especificidad (Rockey DC *et al.*, 2005). La colonoscopia es la prueba de *screening* de elección en los pacientes de alto riesgo de CCR, como en el caso de síndromes hereditarios, pacientes con antecedentes de CCR y EII de larga evolución. Sin embargo, existe controversia acerca de la mejor prueba de *screening* en el caso de la población general, considerando el riesgo, los costes y la efectividad del procedimiento (Winawer S *et al.*, 2003).

Otras alternativas que se han propuesto para el *screening* del CCR incluyen la sigmoidoscopia flexible, la TC-colonografía y los test de detección de marcadores fecales (Kahi CJ y Rex DK, 2004) (tabla I.1):

Tabla I.1. MÉTODOS DE <i>SCREENING</i> EN CCR					
Test	Descripción	Sensibilidad	Intervalo	Limitaciones	Ventajas
Colonoscopia	Visualización endoscópica de todo el marco cólico.	> 95%	Cada 10 años	Invasiva, preparación intestinal, sedación, elevado coste, no accesible, riesgo de perforación o sangrado.	Elevada sensibilidad, visualiza todo el colon, permite biopsias y terapéutica.
Sigmoidoscopia	Visualización endoscópica del colon distal.	> 95% (colon distal)	Cada 5 años, en combinación con TSOH o TIF	Semi-invasiva, preparación intestinal, elevado coste, no accesible, solo explora el colon distal.	Elevada sensibilidad, permite biopsias y terapéutica en lesiones distales, no sedación.

TC-colonografía	Visualización radiológica de todo el marco cólico.	> 90%	Cada 5 años	Semi-invasiva, preparación intestinal, no permite terapéutica ni biopsia, seguridad radiológica.	Elevada sensibilidad, visualiza todo el colon, no sedación.
TSOH	Detección enzimática de hemoglobina en heces.	33 - 75%	Anual	Pobre detección de lesiones preneoplásicas no permite terapéutica, no discrimina hemoglobina humana.	No invasiva, accesible, bajo coste.
TIF	Detección inmunohistoquímica de hemoglobina humana en heces.	60 - 85%	Anual	Pobre detección de lesiones preneoplásicas no permite terapéutica.	No invasiva, accesible, bajo coste, discrimina hemoglobina humana.

TC: tomografía computerizada; TSOH: test de sangre oculta en heces; TIF: test de inmunohistoquímica fecal.

La alternativa que ha demostrado ser más costo-efectiva en muchos sistemas de salud son los test de detección de sangre oculta fecal (TSOH y TIF) de forma anual, en un sistema de *screening* en dos etapas, con realización de colonoscopia en el caso de positividad de los anteriores. Varios estudios recientes han corroborado una reducción de la mortalidad por CCR siguiendo esta estrategia de cribado entre el 10 y el 40% (Chiu HM *et al.*, 2015; Giorgi Rossi P *et al.*, 2015; Ventura L *et al.*, 2014).

5.5.2. Población de *screening*

La decisión de incluir a los pacientes en un programa de *screening* debe estar fundamentada en el riesgo de desarrollar CCR. Actualmente, no existe consenso en cuanto a los programas de *screening*, sobre todo en pacientes de bajo riesgo, y su aplicación debe ser consensuada en base a las características hereditarias y los factores de riesgo adquiridos de cada grupo de población. Existen multitud de factores de riesgo que pueden predisponer al desarrollo de CCR, si bien la mayoría de los sistemas de *screening* se basan exclusivamente en la edad y los antecedentes

familiares, considerando que el resto de los factores de riesgo no presentan suficiente entidad como para incluirlos en las guías de práctica clínica (Rex DK *et al.*, 2017).

En base a esto, para poder incluir a los pacientes en los diferentes sistemas de *screening*, se deberá hacer un análisis para subclasificarlos según su nivel de riesgo. Los pacientes de alto riesgo serán aquellos con antecedentes personales de CCR o pólipos adenomatosos, la presencia de uno o más familiares de primer grado con antecedente de CCR, la presencia de dos o más familiares de segundo grado con antecedente de CCR, la historia familiar o personal de enfermedades hereditarias predisponentes a CCR (como la poliposis adenomatosa familiar o el SL), el diagnóstico de EII de larga evolución con colitis extensa y el antecedente personal de radioterapia en la infancia. Los pacientes que no presenten ninguna de estas características serán considerados como de bajo riesgo.

En el caso de los **pacientes de bajo riesgo**, en Estados Unidos, las *U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer Guidelines* recomiendan en pacientes no afroamericanos el inicio del *screening* a la edad de 50 años, descendiendo a los 45 años en el caso de los afroamericanos por su especial elevado riesgo (Wolf AMD *et al.*, 2018). No obstante, la *American Cancer Society*, recientemente establece la edad de inicio de *screening* en todos los pacientes de bajo riesgo ≥ 45 años, debido al aumento de la incidencia del CCR en este rango de edad. En los pacientes de bajo riesgo, el *screening* se realizará mediante colonoscopia cada 10 años o TIF anual, con finalización del programa a los 75 años o cuando la esperanza de vida sea menor de 10 años (Wolf AMD *et al.*, 2018).

En Europa, en 2003 el Consejo de la Unión Europea recomendó a todos los estados miembros que establecieran en sus sistemas de salud el *screening* para la detección temprana del CCR a todos los individuos de bajo riesgo con edades comprendidas entre los 50 y 75 años mediante la realización de TSOH anual o bianual, seguida de colonoscopia si el resultado es positivo (Council of the European Union, 2003). En la actualidad, la mayoría de los estados miembros cuentan con programas específicos de *screening*, adaptados a sus sistemas de salud, recursos financieros y disponibilidad de la colonoscopia.

Existe una evidencia bastante limitada en cuanto al *screening* en pacientes jóvenes, a pesar del aumento de incidencia del CCR esporádico en este grupo de edad. Un estudio prospectivo en Corea que incluyó 26.316 pacientes en los que se realizó *screening* con TIF a adultos jóvenes asintomáticos no mostró diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad y especificidad para detectar CCR y adenomas avanzados en individuos jóvenes respecto a la población general, observándose un aumento de la precisión diagnóstica en el grupo de edad de 40-49 años respecto a los mayores de 50 (Kim NH *et al.*, 2017), con índices de CCR y adenomas avanzados del 0.8%, 1.8% y 4.3% en los grupos de edad comprendidos entre los 30-39, 40-49 y mayores de 50 años, respectivamente. Resultados similares pueden observarse en otro estudio retrospectivo que incluyó 19.808 pacientes asintomáticos en los que se realizó *screening* con TIF, con una prevalencia de CCR y adenomas avanzados del 0.5%, 1%, 1.5%, 2.5% y 3.8% en los grupos de edad comprendidos entre los 30-34, 35-39, 40-44, 45-49 y 50-59 años, respectivamente (Jung YS *et al.*, 2017).

En el caso de los **pacientes de alto riesgo**, el *screening* dependerá de la edad, el número de familiares afectados, los antecedentes personales de CCR o la presencia previa de lesiones preneoplásicas, según las *U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer Guidelines* (Rex DK, 2017) que se encuentran resumidas en la tabla I.2. Existen además situaciones especiales por su alto riesgo de CCR como es el caso de los síndromes hereditarios. En el caso de la PAF (poliposis adenomatosa familiar) es obligada la realización de test genéticos y colonoscopia en caso de sospecha familiar o cuando se objetiven ≥ 100 pólipos adenomatosos. En aquellos casos confirmados, será necesaria la realización de colonoscopia anual desde la edad de 10 años. En los pacientes con múltiples adenomas de tamaño > 1 cm o con adenomas avanzados, debería plantearse la colectomía profiláctica (Vasen HF *et al.*, 2008). En el caso de pacientes con PAF atenuada debería realizarse colonoscopia anual desde la edad de 20-25 años, planteando la colectomía profiláctica en el caso de adenomas avanzados o de difícil extirpación endoscópica (Knudsen AL *et al.*, 2003).

Tabla I.2. SISTEMAS DE *SCREENING* DE CCR EN INDIVIDUOS DE BAJO Y ALTO RIESGO SEGÚN DIFERENTES GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA (Maida M *et al.*, 2017)

POBLACIÓN	US MULTI-SOCIETY TASK FORCE ON COLORECTAL CANCER GUIDELINES ¹⁵⁷	EUROPEAN GUIDELINES FOR QUALITY ASSURANCE OF CRC SCREENING
-----------	--	--

INDIVIDUOS DE BAJO RIESGO	Inicio: ≥ 50 años (45 años en afroamericanos). Duración: cada 10 años, hasta los 75 años.	Inicio: 50 años. Duración: TSOH anual o bianual, con realización de colonoscopia si es positivo.
INDIVIDUOS DE ALTO RIESGO Un familiar de primer grado con CCR < 60 años/dos o más familiares de primer grado con CCR a cualquier edad	Inicio: ≥ 40 años o 10 años antes del familiar más joven diagnosticado. Cada 5 años.	
Un familiar de primer grado con CCR ≥ 60 años	Inicio: ≥ 40 años. Duración: cada 10 años, hasta los 75 años.	
Uno o más familiares de primer grado con pólipos serrados avanzados	Inicio: ≥ 40 años o 10 años antes del familiar más joven diagnosticado. Cada 5 años.	

TSOH: test de sangre oculta en heces.

En el caso del SL, deberá realizarse colonoscopia anual desde la edad de 20-25 años o 10 años antes del familiar más joven diagnosticado de CCR (Lindor NM *et al.*, 2006).

Los pacientes con EII de larga evolución presentan un aumento del riesgo de cáncer comparado con la población general (Van Assche G *et al.*, 2013), aunque esta asociación es mayor en el caso de los pacientes con colitis ulcerosa (CU). El riesgo de CCR dependerá del tiempo de evolución de la enfermedad y la extensión, aunque este riesgo se encuentra en descenso tras la introducción de los nuevos fármacos antiinflamatorios e inmunomoduladores (Eaden JA, Abrams KR y Mayberry JF, 2001). Independientemente de la extensión de la enfermedad, se recomienda la realización de una colonoscopia inicial de *screening* en todos los pacientes con diagnóstico de CU, con inicio del seguimiento endoscópico aproximadamente 6-8 años después del inicio de los síntomas. En el caso de que el paciente presente colangitis esclerosante primaria (en cuyo caso el riesgo de CCR es aún mayor), deberá realizarse la colonoscopia de forma anual, mientras que en el resto de los pacientes de bajo riesgo se realizará cada

3-4 años, sin precisar seguimiento por colonoscopia en aquellos que solo presenten proctitis (Claessen MM *et al.*, 2009; Connell WR *et al.*, 1994).

Por último, los pacientes que han recibido radioterapia abdominal en la infancia presentan un riesgo de CCR 11 veces superior a la población general. En estos pacientes se recomienda la realización de colonoscopia cada 5 años, con inicio del *screening* 10 años después de la radioterapia o a la edad de 35 años (Nottage K *et al.*, 2012).

Las diferencias en el *screening* de los pacientes con situaciones especiales de alto riesgo se encuentran resumidas en la tabla I.3:

Tabla I.3. SISTEMAS DE *SCREENING* EN SITUACIONES ESPECIALES DE ALTO RIESGO (Maida M *et al.*, 2017)

POBLACIÓN	INICIO DEL <i>SCREENING</i>	DURACIÓN
PAF	A los 10 años.	Anual (considerar colectomía).
PAF Atenuada	A los 20-25 años.	Anual (considerar colectomía).
SL	A los 20-25 años o 10 años antes del familiar más joven diagnosticado.	Anual.
EII crónica	6-8 años después del inicio de los síntomas.	Proctitis: no seguimiento. Colitis extensa sin factores de alto riesgo: cada 3-4 años. Colitis extensa con factores de alto riesgo: cada 1-2 años. Colangitis esclerosante primaria asociada: anual.
Radioterapia abdominal en la infancia	10 años después de la radioterapia o a los 35 años.	Cada 5 años.

PAF, poliposis adenomatosa familiar; *SL*, síndrome de Lynch; *EII*, enfermedad inflamatoria intestinal.

6. Estadificación del CCR. Clasificación TNM

La importancia de los sistemas de clasificación y estadificación del cáncer radica en su valor pronóstico, con el fin de adecuar el tratamiento al tipo y extensión del tumor. La clasificación de Dukes (Dukes CE, 1932) fue el primer sistema de estadificación del CCR con fines pronósticos, la cual aún se encuentra en uso en muchos sistemas de salud (tabla I.4). Actualmente, la clasificación pronóstica para el CCR más utilizada es la clasificación TNM de la *International Union Against Cancer* (UICC) (Haboubi NY, 2008), cuyas siglas hacen referencia a la extensión del Tumor (“T”), ganglios linfáticos afectados (“N”, *node*) y presencia de metástasis (“M”). Además, se pueden incluir prefijos a estas siglas indicando determinadas características concretas como “p” si se incluye el análisis anatomopatológico, “y” si se hace referencia a la estadificación preoperatoria y “u” cuando se refiere al diagnóstico por ultrasonidos (tabla I.5).

Tabla I.4. ESTADIFICACIÓN DEL CCR SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DE DUKES (Dukes CE,1932) Y SU CORRELACIÓN CON LA CLASIFICACIÓN TNM (Haboubi NY, 2008)

CLASIFICACIÓN DUKES		CLASIFICACIÓN TNM	
<i>Estadio</i>		<i>Definición</i>	
A		Limitado a la pared colónica.	
B		Extensión a la serosa o a la grasa mesentérica.	
C	Metástasis a ganglios linfáticos.	<i>Estadio</i>	<i>Definición</i>
D	Metástasis a distancia.	0	TisN0M0
		I	T1N0M0 T2N0M0
		II	T3N0M0 T4N0M0
		III	Cualquier T N1M0 Cualquier T N2M0

Tabla I.5. ESTADIFICACIÓN DEL CCR SEGÚN LA CLASIFICACIÓN TNM (Sobin LH y Wittekind C, 2002) Y LOS ÍNDICE DE SUPERVIVENCIA PUBLICADOS EN LOS DIFERENTES ESTADIOS (Gill S *et al.*, 2004; Greene FL, Stewart AK y Norton HJ, 2004; Gunderson LL *et al.*, 2004; Staib L *et al.*, 2002)

T – Tumor primario				
Tx	El tumor primario no puede ser estudiado.			
T0	No evidencia de tumor primario.			
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial o invasión de la lámina propia.			
T1	El tumor invade la capa submucosa.			
T2	El tumor invade la capa muscular propia.			
T3	El tumor invade la capa subserosa o la grasa perirrectal en el caso del recto.			
T4	El tumor invade órganos vecinos y/o perfora el peritoneo visceral.			
N – Ganglios linfáticos regionales				
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser estudiados.			
N0	No afectación de ganglios linfáticos regionales.			
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales.			
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.			
M – Metástasis a distancia				
Mx	Las metástasis a distancia no pueden ser estudiadas.			
M0	No evidencia de metástasis a distancia.			
M1	Metástasis a distancia.			
Estadio	T	N	M	Supervivencia a 5 años
I	T1, T2	N0	M0	80-95%
IIA	T3	N0	M0	72-75
IIB	T4	N0	M0	65-66%
IIIA	T1, T2	N1	M0	55-60%
IIIB	T3, T4	N1	M0	35-42%
IIIC	Cualquier T	N2	M0	25-27%
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	0-7%

Sin embargo, la clasificación TNM presenta determinadas carencias al no incluir múltiples factores clínicos, histopatológicos y moleculares del CCR que cada vez son más utilizados en la práctica clínica habitual y que, en muchas ocasiones, marcan decisiones terapéuticas por su valor pronóstico. Entre ellos podemos destacar factores histopatológicos, como el grado histológico del tumor, la invasión tumoral linfática, vascular y perineural y la presencia de depósitos extranodales; factores moleculares,

como la mutación en genes supresores y oncogenes como *KRAS*, *BRAF* y *P53* y la mutación en genes MMR; factores anatómicos y quirúrgicos, como el margen circunferencial del tumor, el número de ganglios linfáticos incluidos en la pieza quirúrgica (cuyo corte se establece en 12) y el porcentaje de ellos afecto, la perforación tumoral intraoperatoria y la calidad de la escisión total del mesorrecto en el caso del cáncer de recto; y factores perioperatorios, como el nivel de CEA al diagnóstico o la necesidad de transfusión sanguínea intraoperatoria.

Todos estos factores son considerados en el tratamiento oncológico pre y postoperatorio, si bien su valor pronóstico individual aún no se encuentra claramente establecido y son necesarios más estudios para su inclusión en los sistemas actuales de clasificación pronóstica del CCR (Ahmed Farag AF *et al.*, 2016).

7. Tratamiento y seguimiento del CCR

En cuanto al tratamiento, debemos diferenciar dos entidades diferentes dentro del CCR: el cáncer de colon y el cáncer de recto. La cirugía continúa siendo el tratamiento de elección en ambos, si bien existen múltiples opciones terapéuticas, ajustadas a las características del paciente y el estadio tumoral al diagnóstico.

7.1. Tratamiento endoscópico

Algunas lesiones poco avanzadas se pueden beneficiar del tratamiento local endoscópico. La incidencia de estas lesiones en etapas precoces se encuentra en aumento debido al desarrollo de los programas de *screening* y su exéresis, en muchas ocasiones, es posible realizarla en el mismo acto diagnóstico. La indicación de resección endoscópica o quirúrgica continúa siendo controvertida, si bien con el avance de las técnicas endoscópicas, cada vez son más amplias las indicaciones de resección endoscópica y menores los casos de lesiones poco avanzadas que requieren tratamiento quirúrgico.

El término "cáncer colorrectal temprano" se definió en Japón como la presencia de células neoplásicas en mucosa o submucosa, independientemente de la presencia

o ausencia de metástasis ganglionares (Japanese Society for cancer of colon and rectum, 1997). Estos tumores superficiales corresponden a los estadios Tis y T1 de la clasificación TNM, en los que la infiltración tumoral está limitada a mucosa y submucosa. La principal controversia en este tipo de lesiones tempranas es que la infiltración tumoral submucosa posibilita la invasión vascular y linfática, por lo que los pólipos malignos, aunque se encuentren limitados a esta capa superficial, tienen la posibilidad de desarrollar metástasis ganglionares, en cuyo caso, la resección endoscópica no sería curativa (Cooper HS *et al.*, 1995).

Con intención de estratificar mejor este tipo de lesiones y la posibilidad de resección endoscópica mucosa (REM) o resección endoscópica submucosa (RESM), se han establecido varias clasificaciones macroscópicas y microscópicas, que nos aportan más información del riesgo de exéresis endoscópica según la infiltración tumoral.

Entre las clasificaciones macroscópicas, cabe destacar la clasificación de la Sociedad Japonesa para el estudio del cáncer de colon y recto (tabla I.6), la cual divide el CCR temprano en 3 categorías: lesiones protruyentes o polipoideas, lesiones planas y lesiones deprimidas (Koyama Y y Kotake K, 1997; Kudo S *et al.*, 1997). De esta forma, se consideraron inicialmente los pólipos pediculados como lesiones de bajo riesgo que podían ser manejadas endoscópicamente, mientras que las lesiones sésiles, planas, ulceradas o de extensión lateral eran catalogadas como lesiones de alto riesgo y recomendaban la resección quirúrgica como tratamiento definitivo (Kudo S *et al.* 1997).

Posteriormente, estas categorías fueron matizadas por la clasificación de París (The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach and colon, 2002). Según la clasificación de París (tabla I.6), el tipo polipoideo presenta morfología pedunculada/semipedunculada (0-Ip) o sésil (0-Is). El tipo no polipoideo se divide en ligeramente elevado (0-IIa), completamente plano (0-IIb) o ligeramente deprimido sin úlceras (0-IIc). Las lesiones ulceradas o excavadas (0-3) son prácticamente inexistentes. Siguiendo esta clasificación, serían susceptibles de resección mucosa endoscópica lesiones tipo 0-IIa y 0-IIb menores de 2 cm y 0-IIc menores de 1 cm, no siendo recomendable en aquellas deprimidas o ulceradas (0-3) (Waye JD, 2001).

Tabla I.6. Clasificación macroscópica para el cáncer colorrectal temprano de la Sociedad Japonesa para el estudio del cáncer de colon y recto (Japanese Society for cancer of colon and rectum, 1997)		
<i>Características endoscópicas</i>	<i>Tipo</i>	<i>Descripción</i>
Lesiones protruyentes	Ip Isp Is	Pólipos pedunculados Pólipos semipedunculados Pólipos sésiles
Lesiones planas	IIa IIb	Elevación plana de la mucosa Cambios mucosos planos
Lesiones deprimidas	IIc IIa+IIc IIc+IIa	Depresión mucosa Elevación plana con depresión central Depresión mucosa con borde elevado
Clasificación endoscópica de París de las lesiones neoplásicas colorrectales superficiales (The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach and colon, 2003).		
<i>Características endoscópicas</i>	<i>Tipo</i>	<i>Descripción</i>
Lesiones polipoideas	0-Ip 0-Is	Pólipos pedunculados Pólipos sésiles
Lesiones no polipoideas	0-IIa 0-IIb 0-IIc	Superficial elevada Completamente plana Superficial, deprimida sin ulceración
Lesiones no polipoideas excavadas	0-3	Excavadas y ulceradas

Estas clasificaciones se siguen utilizando como guías útiles para distinguir lesiones susceptibles de tratamiento endoscópico de las que no lo son. No obstante, no existe ninguna considerada como clasificación estándar, lo que conlleva diferencias importantes en la definición e interpretación de las lesiones (Ruiz-Tovar J *et al.*, 2010).

Las clasificaciones microscópicas más utilizadas son la de Haggitt (Haggitt RC *et al.*, 1985) y Kikuchi (Kikuchi R *et al.*, 1995). Haggitt clasificó el CCR temprano en lesiones pediculadas y sésiles. Las lesiones pediculadas tienen tallos con longitudes mayores que su diámetro, mientras que las sésiles no. Los pólipos se estratifican en función del grado de invasión (tabla I.7): los niveles de invasión 1, 2 y 3 presentan bajo riesgo de metástasis ganglionares y pueden ser tratados mediante resección endoscópica (Haggitt RC *et al.*, 1985) (figura I-14). Haggitt definió la invasión submucosa en los pólipos sésiles como grado 4 en todos y, por tanto, de mal pronóstico.

Tabla I.7. Grado de invasión en lesiones polipoideas según la clasificación de Haggitt (Haggitt RC <i>et al.</i> , 1985)	
Grado 0	Invasión mucosa por encima de la <i>muscularis mucosae</i> (carcinoma <i>in situ</i>).
Grado 1	Invasión de la submucosa, limitada a la cabeza del pólipo.
Grado 2	Invasión de la submucosa a nivel del cuello.
Grado 3	Invasión de la submucosa a nivel del tallo.
Grado 4	Invasión de la submucosa por debajo del tallo, sin alcanzar la muscular propia.

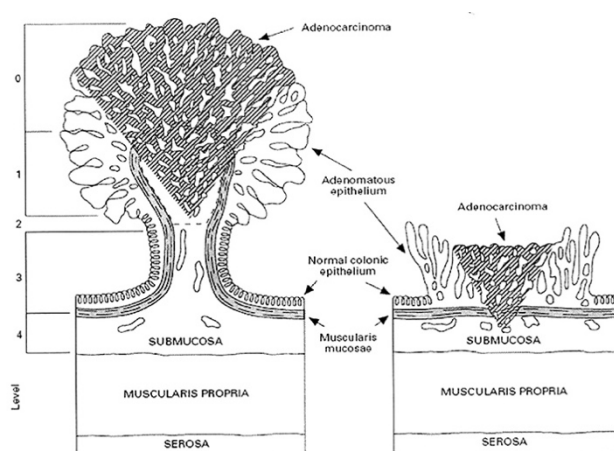


Figura I.13. Clasificación de Haggitt de las lesiones malignas colorectales polipoideas (izquierda) y sésiles (derecha) (Haggitt RC *et al.*, 1985).

A pesar de que la clasificación de Haggitt continúa siendo utilizada en la práctica clínica habitual, ésta pierde utilidad en las lesiones planas. En este caso, la clasificación más aceptada es la de Kikuchi (Kikuchi R *et al.*, 1995) (figura I.15 y tabla I.8). Una lesión Sm1a o una Sm1b sin invasión vascular no tiene riesgo de metástasis linfática, sin embargo, las lesiones con compromiso más profundo sí tienen la capacidad de metastatizar, lo que determinará la necesidad de agregar tratamiento quirúrgico tras la escisión endoscópica de la lesión (Repici A *et al.*, 2009).

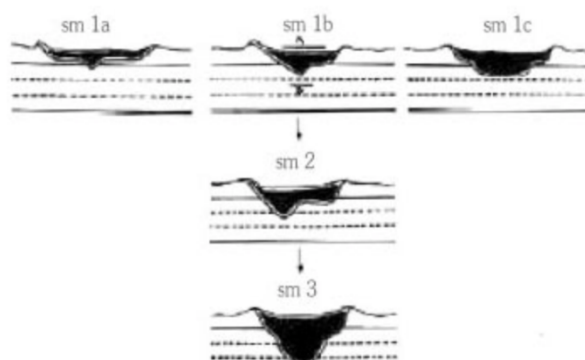


Figura I.14. Clasificación de Kikuchi del grado de invasión submucosa en las lesiones malignas colorrectales planas (Kikuchi R *et al.*, 1995).

Tabla I.8. Invasión submucosa en el CCR temprano según la clasificación de Kikuchi de lesiones planas (Kikuchi R <i>et al.</i> 1995)	
<i>Sm1</i>	Tercio superior de la submucosa.
<i>Sm1a</i>	Invasión de la submucosa menor a 25% del espesor del tumor.
<i>Sm1b</i>	Invasión de la submucosa entre 25 y 50% del espesor del tumor.
<i>Sm1c</i>	Invasión de la submucosa mayor al 50% del espesor tumoral.
<i>Sm2</i>	Tercio medio de la submucosa
<i>Sm3</i>	Tercio inferior de la submucosa

La tabla I.9 resume las indicaciones para la resección endoscópica del CCR temprano (Ruiz-Tovar J *et al.*, 2010).

Tabla I.9. Indicaciones de resección endoscópica del cáncer colorrectal temprano (Ruiz-Tovar J <i>et al.</i> , 2010)	
Lesiones polipoideas pedunculadas (0-Ip)	Haggitt 1, 2 y 3. Lesiones < 2 cm. Tumores bien o moderadamente diferenciados. Ausencia de afectación vascular o linfática. Infiltración de la submucosa en profundidad < 1-2 micras desde la <i>muscularis mucosae</i>. Anchura máxima de afectación en la submucosa < 4 micras. Resección en bloque.

Lesiones polipoideas sésiles (0-Is) y no polipoideas elevadas (0-IIa), planas (0-IIb)	Tumores bien o moderadamente diferenciados. Ausencia de afectación vascular o linfática. Infiltración de la submucosa en profundidad < 1-2 micras desde la <i>muscularis mucosae</i>. Anchura máxima de afectación en la submucosa < 4 micras. Resección en bloque.
Lesiones no polipoideas deprimidas no ulceradas (0-IIc)	Lesiones < 1 cm. Tumores bien o moderadamente diferenciados. Ausencia de afectación vascular o linfática. Infiltración de la submucosa en profundidad < 1 micra desde la <i>muscularis mucosae</i>. Anchura máxima de afectación en la submucosa < 4 micras. Resección en bloque.

7.2. Cirugía

La cirugía es el tratamiento con intención curativa de elección para los pacientes con CCR no metastásico, aunque sus resultados están directamente relacionados con la calidad de la cirugía, el abordaje preoperatorio y la indicación (Van de Velde CJ *et al.*, 2014). La disección quirúrgica ha de seguir los planos embriológicos adecuados para asegurar que el tumor y el tejido ganglionar linfático principal son correctamente extirpados, así como los márgenes circunferenciales de resección. En el cáncer de colon no está justificado actualmente el tratamiento neoadyuvante. Sin embargo, en el caso del cáncer de recto localmente avanzado el tratamiento neoadyuvante es fundamental para mejorar el éxito quirúrgico y disminuir el riesgo de recurrencia. En cualquier caso, el abordaje multidisciplinar con un adecuado estudio y preparación preoperatorios es mandatorio (Van de Velde CJ *et al.*, 2014).

7.2.1. Estudio preoperatorio y estadificación tumoral

Se deben considerar múltiples factores antes de establecer la indicación quirúrgica del paciente, como son la edad, las comorbilidades y la situación funcional, el estadio tumoral, la técnica quirúrgica (incluyendo las posibilidades de reconstrucción) y la esperanza y calidad de vida postoperatoria.

Es fundamental el estudio preoperatorio de todo el marco cólico, con el fin de detectar posibles neoplasias sincrónicas que pueden diagnosticarse hasta en el 4% de los pacientes (Mulder SA *et al.*, 2011). En base a esto, si no es posible la realización de una colonoscopia completa, antes de la cirugía deberá realizarse una TC-colonografía o una colonoscopia postoperatoria en los 3 meses siguientes a la cirugía (Mulder SA *et al.*, 2011). Como se ha indicado previamente, deberá realizarse una TC de tórax y abdomen preoperatoria, con el fin de descartar la presencia de metástasis a distancia, pudiendo completar el estudio con una RM hepática si existen dudas diagnósticas. En el caso del cáncer de recto, deberá añadirse en el estudio preoperatorio la RM de recto y la ecografía endorrectal como parte del estudio de estadificación. El consejo genético deberá ofrecerse a todos los pacientes jóvenes con historia familiar de CCR.

7.2.2. Técnica quirúrgica

Con el fin de mejorar los resultados quirúrgicos y disminuir el riesgo de complicaciones postoperatorias, deberán indicarse protocolos de rehabilitación precoz y técnicas mínimamente invasivas, cuando sea posible.

La cirugía laparoscópica ha demostrado ser tan segura como la cirugía abierta, disminuyendo las complicaciones postoperatorias y el tiempo de recuperación del paciente (Bonjer HJ, 2015; Colon Cancer Laparoscopic or Open Resection Study Group, 2009). Como en cualquier procedimiento quirúrgico, se debe realizar una selección apropiada del paciente, siendo contraindicaciones relativas para la cirugía laparoscópica la presencia de obstrucción o perforación intestinal, el antecedente de cirugías abdominales previas, estadios avanzados de la enfermedad o comorbilidades del paciente (Van de Velde CJ *et al.*, 2014; Colon Cancer Laparoscopic or Open Resection Study Group, 2009).

Es fundamental respetar los planos anatómicos del mesocolon, fascias peritoneales y retroperitoneo, no solo para adecuar los márgenes de resección tumoral, sino para evitar lesiones inadvertidas de otros órganos. De la misma manera, se deben asegurar los márgenes vasculares mesentéricos, con el fin de adecuar la linfadenectomía al tipo de tumor, pero preservando una adecuada vascularización de

los cabos anastomóticos. En el caso de realización de anastomosis, es fundamental la ausencia de tensión y torsión de ambos segmentos con el fin de disminuir el riesgo de dehiscencia anastomótica. Algunos pacientes precisarán la realización de un estoma permanente o transitorio, ya sea con intención protectora o derivativa, más frecuentes en el caso de tumores distales, cirugía rectal o situaciones de obstrucción intestinal, siempre indicados de manera individualizada (Kuipers EJ *et al.*, 2015). En el caso de pacientes que debuten con obstrucción intestinal por tumores distales, se puede considerar la colocación de un *stent* preoperatorio con el fin de reducir la morbilidad perioperatoria, mejorar la calidad de la cirugía y reducir la necesidad de realización de estomas derivativos (Van de Velde CJ *et al.*, 2014).

En el caso del cáncer de recto, el abordaje es diferente respecto a la cirugía del colon. Existen múltiples opciones terapéuticas y técnicas quirúrgicas, cuya intención es adecuar el tratamiento al estadio tumoral para minimizar las secuelas quirúrgicas, mejorar la calidad de la cirugía y disminuir el riesgo de recurrencia locorregional y a distancia, intentando cuando sea posible la preservación esfinteriana y disminuyendo la necesidad de estomas permanentes.

Por su especial disposición anatómica y dificultad quirúrgica, en los últimos años se han desarrollado múltiples técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas para el cáncer de recto, con una importante mejoría de las complicaciones y los resultados funcionales, respecto a la cirugía abierta. En el caso de tumores poco avanzados, se han desarrollado varias técnicas mínimamente invasivas para la escisión local del tumor. La microcirugía transanal endoscópica (TEM, *transanal endoscopic microsurgery*) es una técnica para escisión local de tumores T1N0 bien diferenciados y sin datos de mal pronóstico histológico (De Graaf EJR *et al.*, 2009; Doornebosch PG, Zeestraten E y de Graaf EJR, 2011), la cual consiste en la escisión local del tumor a través de la región anal de forma endoscópica, con excelentes resultados funcionales y de calidad de vida, pero con elevado índice de recurrencias locales por lo que no se recomienda en tumores pobremente diferenciados. La alta complejidad técnica de la cirugía, así como el elevado coste del instrumental necesario ha derivado en el desarrollo de otras técnicas, con especial relevancia de la cirugía transanal mínimamente invasiva (TAMIS, *transanal minimally invasive surgery*). Esta técnica de abordaje transanal permite la utilización del material convencional de laparoscopia a través de un dispositivo monopuerto, el cual

disminuye los costes y la curva de aprendizaje, siendo actualmente la técnica de elección en tumores T1N0 sin datos de mal pronóstico (Martin-Pérez B *et al.*, 2014).

En el caso de tumores T1, T2 y T3 sin datos de mal pronóstico (T3 superficiales, con ausencia de afectación linfática y exclusión de tumores muy bajos), la técnica quirúrgica de elección es la escisión total del mesorrecto (ETM). En los tumores con factores de mal pronóstico, la ETM se recomienda tras la aplicación de tratamiento neoadyuvante, con intención de disminuir el riesgo de recurrencia local (Nagtegaal ID *et al.*, 2002; Quirke P *et al.*, 2009; Heald RJ, Husband EM y Ryall RD, 1982). La ETM se puede realizar mediante cirugía abierta o laparoscópica, con similares índices de recurrencia locorregional, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, por lo que, cuando sea posible, será de elección el abordaje mínimamente invasivo (Bonjer HJ *et al.*, 2015).

En el caso de tumores rectales localmente avanzados, la ETM se relaciona con mayor pérdida sanguínea, mayor tiempo quirúrgico, posibilidad de complicaciones postoperatorias como la dehiscencia anastomótica y múltiples problemas funcionales englobados dentro del llamado síndrome de resección anterior baja (LARS, *low anterior resection syndrome*), el cual puede incluir dolor pélvico crónico, disfunción esfinteriana y problemas genitourinarios. La cirugía robótica puede ayudar a mejorar estos resultados, si bien aún no ha demostrado una clara superioridad respecto a la cirugía laparoscópica (Ramji KM *et al.*, 2016).

7.2.3. Tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto

Las recurrencias locales tras la cirugía de recto en los tumores localmente avanzados se pueden minimizar con la utilización de un ciclo corto de radioterapia (RT) de forma neoadyuvante, seguida de la ETM (Kapiteijn E *et al.*, 2001; Folkesson J *et al.*, 2005). El mejor momento para realizar la cirugía tras la aplicación de la RT es importante y continúa actualmente en discusión, ya que un periodo de espera prolongado se asociará con un mayor efecto de la RT, pero una mayor tasa de complicaciones quirúrgicas, incluyendo el LARS, en relación con los fenómenos de isquemia, fibrosis y denervación pelviana que induce la RT (Juul T *et al.*, 2014). Actualmente, el tiempo más aceptado para la realización de la cirugía tras la finalización de la neoadyuvancia es de

6-8 semanas, aunque muchos centros han extendido el periodo hasta 10 semanas, con buenos resultados (Lefevre JH *et al.*, 2016).

Los tumores que más se beneficiarán del tratamiento neoadyuvante serán los tumores T3 con mal pronóstico (aquellos que invaden la grasa mesorrectal más de 5 mm, que se aproximan a menos de 2 mm a la fascia mesorrectal o con afectación linfática ganglionar) y los tumores T4, pudiendo asociar quimioterapia (QT) a la neoadyuvancia según el paciente y las características del tumor, con intención de disminuir además el riesgo de metástasis a distancia (García M *et al.*, 2015).

Tras finalizar el tratamiento neoadyuvante, será necesaria la reestadificación tumoral mediante una nueva exploración física, una endoscopia y una RM, si bien el resultado ésta no debería alterar la planificación del tratamiento pre-neoadyuvancia (Consensus statement on the multidisciplinary management of patients with recurrent and primary rectal cancer beyond total mesorectal excision planes, 2013). No obstante, existen algunos pacientes en los que tras finalizar la neoadyuvancia se puede observar una respuesta clínica completa del tumor, la cual se define por la ausencia de evidencia de neoplasia tanto en la exploración, como en la endoscopia y la RM, teniendo en cuenta que una respuesta clínica completa puede no asociarse con una respuesta patológica completa. En estos pacientes se puede optar por una estrategia no quirúrgica (*Watch & Wait*) en casos seleccionados, evidenciándose altas tasas de respuesta y bajo índice de recurrencia en algunas series (Habr-Gama A *et al.*, 2011; Maas M *et al.*, 2011), si bien en la actualidad esta estrategia no se encuentra incluida en las guías de práctica clínica del cáncer de recto y serán necesarios estudios prospectivos randomizados para esclarecer su utilidad futura en la práctica habitual.

En los pacientes con CCR resecable e IMS, el estudio NICHE ha reportado resultados favorables con el uso de inmunoterapia de forma neoadyuvante, combinando nivolumab (anticuerpo monoclonal anti-PD1) con ipilimumab (anticuerpo monoclonal anti-CTLA4), con índices de respuesta patológica completa de hasta el 60% (Chalabi M *et al.*, 2020). Este estudio abre la puerta al uso de la inmunoterapia como tratamiento neoadyuvante en estos pacientes, incluso en monoterapia y dentro de estrategias preservadoras de órgano, con resultados prometedores en respuesta tumoral y disminución de efectos adversos, aunque actualmente en estudio.

7.2.4. Calidad de la cirugía

La calidad de la cirugía se puede determinar mediante el análisis de la pieza quirúrgica, siendo prioritarios el margen circunferencial y distal libre de células tumorales, la escisión mesocólica o mesorrectal completa (la cual está determinada por la presencia de, al menos, 12 ganglios linfáticos en el análisis anatomopatológico) y la integridad completa de la fascia mesorrectal en el cáncer de recto. Para homogeneizar la práctica clínica en Europa y optimizar los resultados en el tratamiento de estos pacientes, en 2007 se crea un equipo internacional multidisciplinar para la mejora en la calidad asistencial, el *European Registration of Cancer Care* (EURECCA) (Van de Velde CJH *et al.*, 2013).

7.2.5. Manejo postoperatorio

Los protocolos de rehabilitación precoz como *fast track* o *Enhanced Recovery After Surgery* (ERAS) se han diseñado con el fin de minimizar las complicaciones quirúrgicas y facilitar la recuperación del paciente (Lassen K *et al.*, 2009). Estos protocolos describen una serie de vías clínicas y procedimientos durante todo el proceso perioperatorio, incluyendo elementos como la dieta, ejercicio y preparación intestinal preoperatorios; el manejo de fluidos y la prevención del íleo paralítico con la utilización de técnicas mínimamente invasivas durante la cirugía; y el inicio precoz de la dieta y la movilización durante el postoperatorio (Lassen K *et al.*, 2009).

7.3. Tratamiento sistémico de la enfermedad primaria

En los últimos 15 años se han experimentado importantes mejoras en el tratamiento del CCR avanzado que han tenido una influencia sobre el tratamiento adyuvante en la enfermedad primaria. Desde la introducción del 5-FU (5-fluoracilo) hasta la actualidad se han sucedido una serie de ensayos clínicos aleatorizados que han determinado la generalización progresiva del tratamiento adyuvante en el CCR.

Los índices de curación en los tumores en estadio I y II tratados únicamente con cirugía son elevados, estimando que únicamente un 5% de estos pacientes se

beneficiarían de tratamiento adyuvante con QT. No obstante, las guías de práctica clínica recomiendan considerar el tratamiento sistémico adyuvante en los casos de alto riesgo, como en los tumores pobremente diferenciados, cuando se obtienen < 12 ganglios en la pieza quirúrgica, en los casos con invasión vascular, linfática o perineural, en los tumores que debutan con obstrucción o perforación y en los tumores pT4 independientemente de la afectación linfática (Labianca R *et al.*, 2013). Por el contrario, el tratamiento adyuvante se considera estándar en el estadio III.

El primer estudio que demuestra un beneficio de la QT adyuvante con la combinación de 5-FU y levamisol lo publicó el grupo de la Clínica Mayo en el año 1989 (Laurie JA *et al.*, 1989). Pocos años después, los resultados del NCCTG (*North Central Cancer Treatment Group*) (O'Connell MJ *et al.*, 1998) y del estudio IMPACT (*International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials*) (IMPACT Investigators, 1995; QUASAR Collaborative Group, 2000) demostraron el beneficio del tratamiento adyuvante con 5-FU en combinación con leucovorín (LV). Estudios posteriores corroboraron la superioridad de la combinación de 5-FU con LV respecto a la combinación con levamisol y se confirmó que la duración del tratamiento adyuvante podía limitarse a 6-8 meses (O'Connell MJ *et al.*, 1997). Como resultado de estos estudios, se estableció el estándar de tratamiento postoperatorio en el CCR de alto riesgo con 5-FU modulado con LV administrado en bolos en cualquiera de los esquemas de tratamiento validados en estudios de fase III, de los cuales los más usados son el esquema de la Clínica Mayo (6 meses) y el esquema de Roswell Park (8 meses) (O'Connell MJ *et al.*, 1998; IMPACT Investigators, 1995). Posteriormente, varios estudios han evaluado esquemas de tratamiento con menor toxicidad, como la administración de 5-FU en infusión continua (Meta-analysis Group in Cancer, 1998).

También se han incorporado esquemas con fluoropirimidinas orales (como la capecitabina) con claras ventajas, como la comodidad de la posología y la menor toxicidad (Scheithauer W *et al.*, 2003). En 2004, el estudio MOSAIC demostró que la adición de oxaliplatino a la QT convencional basada en 5-FU/LV también aportaba mejoría en cuanto a supervivencia libre de enfermedad en pacientes en estadio III (Andre T *et al.*, 2004). Este régimen de tratamiento adyuvante demostró un claro beneficio en la supervivencia libre de enfermedad a 3 años a favor del esquema FOLFOX4 (oxaliplatino/5-FU/LV).

En la actualidad, la combinación de 5-fluoracilo (con capecitabina oral, en el protocolo XELOX o 5-FU intravenoso, en el protocolo FOLFOX4) y oxaliplatino, es el tratamiento estándar de elección en pacientes en estadio III y pacientes en estadio II con factores de riesgo (Kuipers EJ *et al.*, 2015).

En el caso del cáncer de recto, se puede añadir QT-RT como tratamiento adyuvante en los casos en los que no se haya administrado de forma preoperatoria y en los que se observen datos de mal pronóstico tras la cirugía, normalmente también basada en fluoropirimidinas.

7.4. Tratamiento de la enfermedad metastásica

La supervivencia de los pacientes con CCR metastásico ha aumentado de forma importante en los últimos 20 años, debido al uso de agentes quimioterápicos como el oxaliplatino y el irinotecán, el uso de terapias monoclonales dirigidas y la mejoría en los resultados quirúrgicos en la enfermedad metastásica.

El esquema de QT estándar en la enfermedad metastásica se basa en el protocolo FOLFOX (5-FU/oxaliplatino/LV) o el protocolo FOLFIRI (5-FU/irinotecán/LV). El 5-FU en el protocolo FOLFOX puede ser sustituido por capecitabina, pero resulta más tóxico que el protocolo FOLFIRI si se combina con irinotecán. En casos seleccionados, se puede utilizar un régimen extendido, el protocolo FOLFOXIRI, que incluye 5-FU, LV, oxaliplatino e irinotecán (Van Cutsem E *et al.*, 2014). En pacientes mayores o con importantes comorbilidades, en los que no es posible un régimen más agresivo de QT, se puede realizar un tratamiento secuencial de QT con 5-FU añadiendo terapias dirigidas, como anticuerpos monoclonales anti VEGF-A (bevacizumab).

Las terapias con anticuerpos dirigidos se pueden clasificar en 3 grandes grupos de fármacos: los anticuerpos monoclonales anti-EGFR (cetuximab y panitumumab), los anticuerpos monoclonales anti-VEGF-A (bevacizumab) y las proteínas de fusión dirigidas a múltiples factores de crecimiento (aflibercept) o inhibidores de quinasas (regorafenib). El 80% del CCR presenta expresión de EGFR y su sobreexpresión se relaciona con menor supervivencia global y mayor riesgo de metástasis, por lo que la utilización de estos anticuerpos en pacientes con enfermedad avanzada al diagnóstico

o aquellos que desarrollan resistencia a QT, puede mejorar el índice de supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, siempre que no expresen mutación en *KRAS* o *NRAS* (Douillard JY *et al.*, 2013). El uso de bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A) en combinación con 5-FU e irinotecán u oxaliplatino en pacientes con enfermedad avanzada, aumenta la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global respecto al tratamiento exclusivo con QT (Hurwitz H *et al.*, 2004), incluso aumenta la supervivencia en aquellos casos con enfermedad en progresión refractaria a QT (Kubicka S *et al.*, 2013).

En los pacientes con CCR metastásico en hígado y/o pulmón en los que la enfermedad metastásica es potencialmente resecable, se debe considerar la cirugía de las metástasis como primera elección de tratamiento (Evrard S *et al.*, 2014). En la mayoría de los pacientes, sin embargo, la enfermedad metastásica no es susceptible de cirugía como primera opción, en cuyo caso se puede asociar QT con intención de convertir la enfermedad en potencialmente resecable, con cifras de supervivencia de hasta un 20% si se consigue la resecabilidad (Ayez N *et al.*, 2012). En estos casos, el régimen de QT más recomendado es el protocolo FOLFOXIRI (Falcone A *et al.*, 2007), pudiendo utilizar FOLFIRI con cetuximab en los casos con *RAS* nativo (Heinemann V *et al.*, 2014).

Por último, en aquellos pacientes con enfermedad metastásica e IMS, el estudio KEYNOTE 177 (André T *et al.*, 2020) demostró que el uso de pembrolizumab (anticuerpo monoclonal altamente selectivo anti-PD1) en monoterapia produce un importante aumento de la supervivencia libre de enfermedad en comparación con el tratamiento con QT, ya sea en esquema FOLFOX o FOLFIRI, con o sin bevacizumab o cetuximab, con una reducción significativa de los eventos relacionados con el tratamiento, aceptándose desde entonces su uso en primera línea como monoterapia en estos pacientes.

7.5. Seguimiento

El objetivo del seguimiento tras finalizar el tratamiento del CCR con intención curativa es mejorar la supervivencia, el tiempo libre de enfermedad y detectar de forma precoz las posibles recurrencias, disminuyendo además el coste relacionado con la

recidiva de la enfermedad. Debido a la heterogeneidad en los estudios publicados, no es posible establecer una pauta de seguimiento estándar, si bien la mayoría de las guías de práctica clínica recomiendan el seguimiento con colonoscopia durante al menos 3-5 años para detectar posibles neoplasias metacrónicas (Weitz J, Koch M y Debus J, 2005). El seguimiento, además, debería incluir la determinación del CEA cada 3-6 meses durante 5 años, así como la realización de pruebas de imagen de tórax y abdomen (prioritariamente, mediante TC) de forma regular, con el fin de detectar posibles metástasis hepáticas o pulmonares (Chau I *et al.*, 2004).

La mayoría de las guías de práctica clínica coinciden en que el riesgo de recidiva del CCR tratado con intención curativa tras 5 años de seguimiento es prácticamente equiparable a la población general, por lo que a partir de ese momento el seguimiento se realizará en base al sistema de *screening* habitual de cada sistema sanitario (Johnson FE y Virgo KS, 2004).

8. CCR familiar: síndrome de Lynch, poliposis adenomatosa familiar y otros síndromes hereditarios

La mayoría del CCR es de tipo esporádico, aunque muchos pacientes, sobre todo en el caso de CCRJ, serán diagnosticados en el contexto de síndromes de CCR hereditario. Las mutaciones germinales en genes que predisponen al desarrollo de CCR se encuentran bien estudiadas y suponen aproximadamente el 5% de todos los diagnósticos de CCR (Ogino S *et al.*, 2008).

8.1. Síndrome de Lynch (SL)

El SL es la causa más frecuente de CCR hereditario y supone el 2-4% de todos los diagnósticos de CCR (Hampel H *et al.*, 2008). Se trata de una enfermedad autosómica dominante, causada por la mutación germinal en uno de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* o *EPCAM*). Esta mutación dará como resultado la aparición de IMS con predisposición al desarrollo de CCR y otras neoplasias malignas extracolónicas, como tumores de endometrio, intestino delgado, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, tracto hepatobiliar y tumores sebáceos de piel (Giardiello FM *et al.*, 2014).

Las mutaciones en *MLH1* y *MSH2* suponen aproximadamente el 90% de los casos de SL, las mutaciones en *MSH6* suponen el 10%, siendo las menos frecuentes las mutaciones en *PMS2* y la delección en el gen *EPCAM*. El 90% de los pacientes con SL presentarán IMS, a diferencia del 12% observado en el CCR de tipo esporádico. Las mutaciones en *BRAF*^{V600E} se encuentran en aproximadamente el 15% del CCR esporádico (Giardiello FM *et al.*, 2014). Estos tumores se desarrollarán a través del CIMP, con predominio de IMS y mutación en *MLH1*. En pacientes con SL, habitualmente se observan mutaciones germinales en *MLH1* cuyo resultado es la IMS, pero generalmente no presentan mutaciones en *BRAF* (Bessa X *et al.*, 2008).

El diagnóstico del SL se realizará a partir de los datos clínicos del paciente, en base a sus antecedentes personales y familiares, el análisis de la IMS y/o la inmunohistoquímica de los tumores, y el estudio molecular en búsqueda de variantes patogénicas germinales en los genes MMR. En ocasiones, el diagnóstico clínico supone un reto debido a la gran heterogeneidad clínica de esta enfermedad. En el año 1991, se establecieron los criterios de Amsterdam I (Vasen HF *et al.*, 1991) con la intención de unificar estos criterios clínicos. Posteriormente, en el año 1998 se establecieron los criterios de Bethesda (Boland CR *et al.*, 1998) para determinar a los candidatos al estudio de IMS y/o inmunohistoquímica. En estos casos, sólo se requiere del cumplimiento de al menos uno de los criterios de Bethesda. Debido a que los criterios de Amsterdam I eran muy estrictos y excluían a familias con pocos miembros o con manifestaciones extracolónicas, en el año 1999 se desarrollaron los criterios de Amsterdam II (Vasen HF *et al.*, 1999). Finalmente, en el año 2004, se propusieron los criterios revisados de Bethesda (Laghi L *et al.*, 2004), donde se ampliaban los criterios anteriores (tabla I.10).

Tabla I.10. Criterios clínicos del síndrome de Lynch (Laghi L *et al.*, 2004; Vasen HF *et al.*, 1999; Boland CR *et al.*, 1998; Vasen HF *et al.*, 1991)

Amsterdam I

1. Tres o más familiares con CCR, uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos.
2. Dos generaciones afectadas.
3. Uno o más casos de CCR diagnosticados antes de los 50 años.
4. Excluir el diagnóstico de PAF.

Bethesda

1. Familias que cumplen los criterios de Amsterdam.
2. Individuos con 2 cánceres asociados al CCRHNP, incluyendo CCR sincrónicos y metacrónicos o cánceres extracolónicos asociados al CCRHNP.
3. Individuos con CCR y un familiar de primer grado con CCR y/o un cáncer extracolónico asociado al CCRHNP y/o un adenoma colorrectal; uno de los cánceres diagnosticado antes de los 45 años y el adenoma antes de los 40 años.
4. CCR o endometrial diagnosticado antes de los 45 años.
5. CCR derecho con patrón indiferenciado diagnosticado antes de los 45 años.
6. CCR de células en anillo de sello diagnosticado antes de los 45 años.
7. Adenomas diagnosticados antes de los 40 años.

Amsterdam II

1. Tres o más familiares con un cáncer relacionado con el SL (CCR, endometrio, intestino delgado, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, tracto hepatobiliar, tumores sebáceos de piel), uno de los cuales es familiar de primer grado de los otros dos.
2. Al menos en dos generaciones afectadas.
3. Uno o más casos de cáncer asociado debe haber sido diagnosticado antes de los 50 años.
4. En los casos de CCR, debe excluirse el diagnóstico de PAF.

Revisados Bethesda

1. CCR diagnosticado antes de los 50 años.
2. Presencia en forma sincrónica o metacrónica de CCR u otro tipo de cáncer relacionado con el SL, independientemente de la edad.
3. CCR con genotipo histológico de IMS-alta (presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, carcinoma con diferenciación mucinosa o en anillo de sello, reacción linfocitaria peritumoral tipo Crohn, patrón de crecimiento medular), diagnosticado antes de los 60 años.
4. Individuos con CCR a cualquier edad, que posean al menos un familiar de primer grado con diagnóstico de CCR u otro cáncer relacionado al SL diagnosticado antes de los 50 años.
5. Individuos con CCR a cualquier edad, que posean dos o más familiares de primer o segundo grado con diagnóstico de CCR u otro cáncer relacionado al SL.

En cuanto al análisis de la IMS, se utilizará el panel Bethesda para clasificar los casos en IMS-alta (o IMS propiamente), IMS-baja y EMS. La inmunohistoquímica evalúa la expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 en el tejido tumoral. Dependiendo de la proteína que no se exprese en el tumor se podrá inferir el gen que podría poseer una alteración y de esta forma dirigir el secuenciamiento génico para la búsqueda de variantes anómalas a nivel germinal. La principal ventaja de la inmunohistoquímica es su efectividad para detectar tumores resultantes de la deficiencia de genes MMR con una sensibilidad del 92% y que actualmente se encuentra disponible en la mayoría de los centros hospitalarios.

El riesgo de desarrollar CCR a lo largo de su vida en los pacientes con SL se sitúa en torno al 70% (Aarnio M *et al.*, 1999). En estos pacientes, la secuencia de progresión de pólipo-adenoma-adenocarcinoma ocurre en menos de 5 años, siendo entorno a 10 años en el CCR esporádico. Igualmente, los pacientes con SL presentan

mayor riesgo de CCR metacrónico (16% a los 10 años y 41% a los 20 años) (Win AK *et al.*, 2013).

Las recomendaciones para el *screening* en estos pacientes se encuentran detalladas en la tabla I.3 (Maida M *et al.*, 2017). Además del *screening* del CCR, se debe tener en cuenta el control ginecológico por la alta incidencia de cáncer de endometrio y cáncer de ovario. El manejo se basa en el examen clínico, ecografía transvaginal, aspirado endometrial y determinación de CA125 de forma anual con inicio a los 30 años, considerando la histerectomía y la salpingooforectomía bilateral profiláctica en mujeres que hayan cumplido el deseo de paridad. En el caso de diagnóstico de CCR o en aquellos pacientes que no deseen el seguimiento continuado con endoscopias, la realización de una colectomía total es preferible frente a la resección segmentaria tumoral (Lynch HT *et al.*, 2009).

8.2. Poliposis adenomatosa familiar (PAF)

La PAF es el segundo síndrome de CCR hereditario más frecuente y supone aproximadamente el 1% de todos los diagnósticos de CCR (Stoffel EM y Kastrinos F, 2014). Se trata de una enfermedad hereditaria, autosómica dominante, producida por una mutación germinal en el gen *APC*. Los pacientes con PAF clásica desarrollarán >100 pólipos colónicos sincrónicos, comenzando en la segunda o tercera década de vida, con un riesgo cercano al 100% de desarrollar CCR durante su evolución. También presentan riesgo elevado de desarrollar otras neoplasias extracolónicas, como tumores duodenales o ampulares, carcinoma papilar de tiroides, tumores desmoides, tumores del sistema nervioso central y tumores adrenales (Stoffel EM y Kastrinos F, 2014).

La mayoría de las mutaciones en el gen *APC* son errores de lectura que producen una interrupción prematura de la proteína APC. Varios estudios han demostrado la asociación entre la localización de la mutación en *APC* y el fenotipo de los pacientes con PAF, con diferencias en la edad de desarrollo, la cantidad de pólipos y la presencia de neoplasias extracolónicas (Nieuwenhuis MH y Vasen HF, 2007). Las mutaciones localizadas cerca del final de la región 5' del gen *APC* darán lugar a un fenotipo atenuado de PAF. La PAF atenuada es una variante más leve, la cual presenta

menor número de pólipos colónicos (< 100), de localización proximal y a una edad de aparición más tardía que en la variante clásica (Nieuwenhuis MH y Vasen HF, 2007).

La poliposis asociada al gen *MUTYH* es un síndrome de poliposis, autosómico recesivo, caracterizado por mutaciones en el gen *MUTYH*, las cuales suponen el 30-40% de los casos de poliposis adenomatosa en los cuales no se detecta mutación en *APC*. Los pacientes con este síndrome pueden presentar gran variedad de fenotipos, en algunos casos con manifestaciones colónicas y extracolónicas muy similares a la PAF, aunque la mayoría de los pacientes presentarán entre 15-100 pólipos, aproximadamente 10 años más tarde que en el caso de la PAF. Los pacientes portadores de una mutación bialélica en este gen tienen un riesgo de CCR del 80% antes de los 70 años, con un riesgo claramente inferior en el caso de los portadores monoalélicos (Terdiman JP, 2009). El *screening* de estos pacientes se encuentra resumido en la tabla I.3 (Maida M *et al.*, 2017).

La indicación del tratamiento quirúrgico no ofrece dudas en los pacientes con diagnóstico establecido de CCR, pero en los pacientes asintomáticos el momento más adecuado para indicar la cirugía es más complejo. En los pacientes pertenecientes a familias con la enfermedad y un alto grado de penetrancia, se considera adecuada la intervención quirúrgica al final de la adolescencia (15-18 años). En otras situaciones, la cirugía profiláctica debe considerarse antes de los 25 años o al primer diagnóstico en caso de edad más avanzada (Church J y Simmang C, 2003). El tipo de cirugía dependerá de las características del paciente, siendo la proctocolectomía total con reservorio ileal la técnica quirúrgica de elección en estos pacientes.

8.3. Síndromes de poliposis hamartomatosa

El **síndrome de Peutz-Jeghers** es un trastorno autosómico dominante predisponente a CCR que se caracteriza por el desarrollo de pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal y lesiones mucocutáneas hiperpigmentadas (Campos FG, Figueiredo MN y Martínez CA, 2015). Está producido por una mutación germinal en el gen supresor de tumores *STK11/LKB1*, la cual se identifica en el 70-80% de las familias afectadas (Chen HM y Fang JY, 2009). Se trata de un trastorno que puede dar lugar a una gran variedad de fenotipos. Los pólipos hamartomatosos se pueden encontrar a lo

largo de todo el tracto gastrointestinal, siendo más frecuentes en el intestino delgado (60-90%) y el colon (50-64%). Estos pacientes presentan un riesgo aumentado de desarrollar CCR, cáncer de mama, páncreas, estómago y ovario, a edades más tempranas que en la población general (Giardiello FM *et al.*, 1987).

El **síndrome de poliposis juvenil** también es un síndrome de poliposis hamartomatosa con herencia autosómica dominante, producido por mutaciones germinales en los genes *SMAD4* y *BMPR1* (Schreibman IR *et al.*, 2005). A diferencia de los pólipos juveniles esporádicos, el número de pólipos es mayor y fundamentalmente se localizan a nivel proximal del tracto gastrointestinal. Los individuos con este síndrome normalmente presentan síntomas inespecíficos en la infancia en forma de anemia, sangrado o dolor abdominal, con una incidencia de CCR entre el 17-22% a los 35 años y aproximadamente el 70% a los 60 años (Schreibman IR *et al.*, 2005). También presentan un riesgo aumentado de cáncer gástrico, pancreático y duodenal.

Por último, cabe destacar los **síndromes hamartomatosos relacionados con el gen *PTEN*** (síndrome de Cowden y síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba). Los pacientes con síndrome de Cowden se caracterizan por lesiones hamartomatosas mucocutáneas y un riesgo aumentado de cáncer de mama, tiroides y endometrio; mientras que el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba se caracteriza por macrocefalia, lesiones pigmentarias cutáneas y pólipos intestinales hamartomatosos (Pilarski R *et al.*, 2011).

9. Características del CCR según su localización en el colon

El CCR también muestra diferencias bien establecidas según su localización en el colon. Anatómicamente, el colon se extiende desde la válvula ileocecal hasta el margen anal, pudiendo diferenciar hasta 7 regiones en su recorrido: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide, recto y ano. Embriológicamente, el colon derecho (el cual incluye el ciego, colon ascendente y región proximal del colon transverso) deriva del intestino medio y se encuentra vascularizado principalmente por la arteria mesentérica superior, mientras que el colon izquierdo (el cual incluye el segmento distal del colon transverso, colon descendente, colon sigmoide y recto) deriva embriológicamente del primitivo intestino grueso y se encuentra

vascularizado por la arteria mesentérica inferior (Iacopetta B, 2002). Anatómicamente, se puede subclasificar el CCR en CCR derecho (CCRD), como aquel que asienta proximal al ángulo esplénico y CCR izquierdo (CCRI), como aquel que se desarrolla en el ángulo esplénico o distal al mismo (Iacopetta B, 2002; Mik M *et al.*, 2017). Además de las diferencias en su origen, estos dos subtipos de CCR presentan características histológicas diferentes.

En condiciones normales, la pared colónica está constituida por 4 capas: la capa mucosa (incluye a su vez el epitelio, la lámina propia y la *muscularis mucosa*), la capa submucosa, la capa muscular (también conocida como *muscularis propria*, y formada por músculo circular y músculo longitudinal) y, por último, la capa serosa, salvo en el caso del recto y el canal anal en los que no existe capa serosa, siendo sustituida por la grasa perirrectal.

Los tumores derechos presentan mayor proporción de adenomas sésiles serrados y adenocarcinomas mucinosos, mientras que los tumores izquierdos presentan predominio de adenocarcinomas tradicionales, vellosos y tubulares (Marzouk O y Schofield J, 2011). Las lesiones precursoras en el colon izquierdo suelen presentar morfología polipoidea y, por tanto, es más sencilla su identificación endoscópica y se diagnostican en etapas menos avanzadas de su desarrollo, con el consiguiente mejor pronóstico. Las lesiones en el colon derecho suelen presentar morfología plana, siendo más complicado su diagnóstico precoz (Gualco G *et al.*, 2006).

Los pacientes con CCRD suelen presentar mayor número de pólipos en su evolución, así como tumores más grandes y pobremente diferenciados, lo cual guarda relación con las diferencias genéticas y moleculares que se pueden observar en ambos subgrupos: los tumores derechos suelen presentar predominio de IMS y CIMP, mientras que los tumores izquierdos suelen presentar IC (Glebov OK *et al.*, 2003). En relación con estas diferencias moleculares, será frecuente observar mutación en genes MMR y *BRAF* en los tumores derechos, con predominio de SCM1 y 3; así como alteración en *TP53*, *APC* y *KRAS*, con predominio de SCM2 y 4, en los tumores izquierdos (Dekker E *et al.*, 2019; Baran B *et al.*, 2018; Lee MS, Menter DG y Kopetz S, 2017).

Estas diferencias entre ambas localizaciones también se pueden observar en los casos de CCR hereditario. Los individuos con PAF, debido a la mutación germinal en *APC*, presentarán gran cantidad de pólipos a lo largo del colon en su evolución, pero prácticamente el 100% de los pacientes serán diagnosticados de CCRI antes de desarrollar tumores derechos. Sin embargo, los pacientes con SL, cuyo origen es la mutación germinal en los genes *MMR* y, por tanto, con predominio de IMS, presentarán predominio de CCRD en su evolución (Lynch HT *et al.*, 1988).

También existen diferencias en cuanto a la epidemiología entre ambos subtipos de tumores. Los tumores derechos suelen ser más frecuentes en mujeres, a edades avanzadas y en áreas de baja incidencia de CCR; los tumores izquierdos se diagnostican predominantemente en varones, a edades más tempranas y son más frecuentes en regiones con alta incidencia de CCR (Iacopetta B, 2002) (figura I-9):

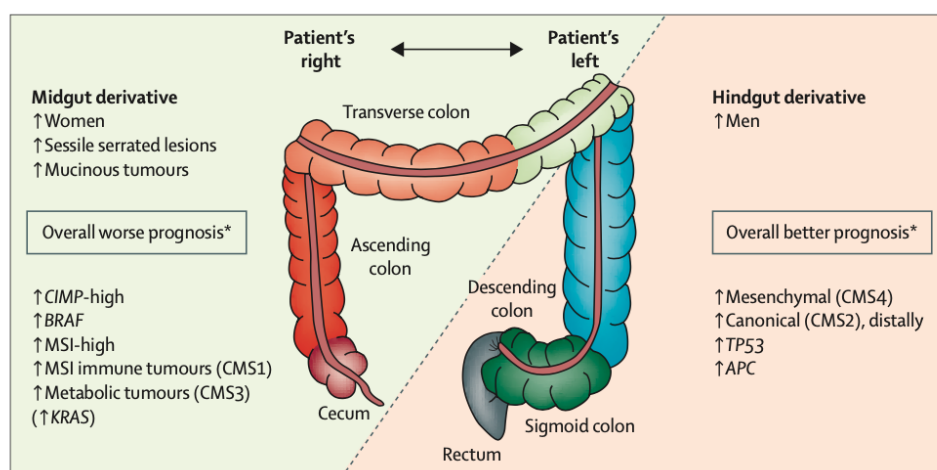


Figura I.15. Características diferenciales del CCRD (ciego, colon ascendente, colon transverso proximal) y CCRI (ángulo esplénico, colon descendente, colon sigmoide y recto). El CCRD es más frecuente en mujeres, con predominio de lesiones sésiles serradas y tumores mucinosos. Presentan elevada frecuencia de IMS y CIMP, con mutaciones en *BRAF* y, ocasionalmente, en *KRAS* (en el caso del CIMP), así como predominio de SCM1 y 3. El CCRI es más frecuente en varones, con predominio de IC, mutaciones en *TP53* y *APC*, siendo frecuentes los SCM2 y 4.

* El peor pronóstico global del CCRD se encuentra en relación con sus características moleculares (IMS y CIMP) pero no se aplica a todos los estadios tumorales, en relación con la respuesta a fármacos anti-VEGF y anti-EGFR y el beneficio de la inmunoterapia en tumores avanzados (Dekker E *et al.*, 2019).

La quimioterapia sistémica para el tratamiento del CCR fundamentalmente se basa en el uso de fluoropirimidinas (5-fluoracilo o 5-FU y capecitabina oral). Su efectividad dependerá del estadio tumoral al diagnóstico y la posibilidad de resección quirúrgica en tumores avanzados, si bien esta terapia adyuvante convencional es más eficaz en pacientes con tumores con EMS o baja frecuencia de IMS, lo que supone que los pacientes que más se beneficiarán de este esquema de tratamiento serán aquellos con tumores izquierdos (Ribic CM *et al.*, 2003). Las terapias dirigidas, como los fármacos anti-VEGF (bevacizumab, aflibercept, ramucirumab y regorafenib) y los fármacos anti-EGFR (cetuximab y panitumumab), se han desarrollado especialmente para los casos de enfermedad metastásica avanzada y su uso en combinación con la quimioterapia convencional mejora la supervivencia global, aunque esta mejoría es claramente superior en el caso del CCRI (Seeber A y Gastl G, 2016). Mientras que la utilización de bevacizumab y quimioterapia sistémica ha mostrado disminución de la mortalidad en ambos subtipos de tumores, la combinación de cetuximab y quimioterapia sistemática se ha mostrado claramente superior en el CCRI (Aljehani MA *et al.*, 2018).

10. Características del CCRJ

El CCRJ es aquel diagnosticado en individuos con edad inferior a 50 años y su incidencia en la actualidad, como hemos comentado previamente, se encuentra en aumento, con especial notoriedad en las últimas décadas. Este aumento en la incidencia es aún mayor en el caso de los tumores rectales (Siegel RL *et al.*, 2017).

Clásicamente, el CCRJ se ha relacionado con síndromes hereditarios predisponentes a cáncer, especialmente el SL, y los sistemas de *screening* convencionales han dirigido sus esfuerzos únicamente a este grupo de pacientes (Silla IO *et al.*, 2014). En la actualidad, este aumento en la incidencia en el CCRJ se ha producido a expensas de los pacientes con CCR de tipo esporádico, con una proporción de 5 de cada 6 diagnósticos de tipo esporádico/EMS (Pearlman R *et al.*, 2017).

A pesar de que la mayoría de los pacientes jóvenes serán de tipo esporádico, existe una elevada predisposición a cáncer en este grupo de pacientes, no solo en los casos conocidos de enfermedades hereditarias predisponentes a cáncer, objetivándose

mutaciones patogénicas en genes relacionados con cáncer en aproximadamente el 13% de los pacientes (Daca Alvarez M *et al.*, 2021).

Considerando el carácter esporádico en aumento en estos pacientes, el estudio de los factores de riesgo y los perfiles moleculares predisponentes a cáncer es fundamental en este grupo de edad. Entre los factores de riesgo personales, independientes de la historia familiar de cáncer, más estudiados en este grupo están la obesidad y la diabetes (Low EE *et al.*, 2020). El aumento exponencial de los pacientes con obesidad (incluyendo aquellos con diabetes asociada) y los cambios en la dieta y los hábitos de vida, asociados con factores ambientales de riesgo, podrían iniciar cambios a nivel genético/epigenético en individuos con mayor susceptibilidad a cáncer (Archanbault AN *et al.*, 2020).

Existen características moleculares diferenciales cuando comparamos a los pacientes con CCRJ respecto al grupo de CCRAT. La IMS es predominante en este grupo de edad, en relación con la mayor proporción de pacientes con SL, pero también pueden observarse perfiles específicos en relación con la IC, con segmentos cromosómicos alterados específicos (Berg M *et al.*, 2010), escaso componente de CIMP y marcadores moleculares concretos en este grupo de edad como la hipometilación de *LINE-1* (Antelo M *et al.*, 2012), la delección homocigota de *NOMO-1* (Perea J *et al.*, 2017), la alteración en *NRF2* (mediador a la respuesta oxidativa al estrés) y su relación con biomarcadores como *CXCL12* de patrones proinflamatorios (Holowatyj AN *et al.*, 2020).

A nivel histopatológico también podemos evidenciar fenotipos específicos en este grupo de pacientes cuando los comparamos con el CCRAT, con predominio de cáncer de colon izquierdo y recto y mayor proporción de tumores mucinosos (Silla IO *et al.*, 2014).

Las estrategias de *screening* en este grupo de edad siguen siendo un desafío, más allá de los pacientes con enfermedades hereditarias conocidas predisponentes a CCR, proponiendo su inicio precoz a los 45 años en países con elevada incidencia, como Estados Unidos (Peterse EFP *et al.*, 2018). Pero incluso en regiones donde no se observa esta elevada incidencia de CCRJ, la identificación de pacientes con

características y factores de riesgo especialmente predisponentes a CCR, debería incluirlos en estrategias de *screening* precoz personalizadas.

Otro aspecto importante en este grupo de edad es el seguimiento para prevenir la aparición de tumores metacrónicos una vez controlada la enfermedad primaria, con periodos de seguimiento elevados en el tiempo, no solo para aquellos pacientes con enfermedades hereditarias conocidas, sino también en los casos esporádicos (Perea J *et al.*, 2019). Igualmente, dado el elevado tiempo de supervivencia tras el tratamiento en estos pacientes, es de elevada importancia mantener una buena calidad de vida, evitando los sobretratamientos y sus efectos adversos que, con el fin de mejorar la supervivencia, en muchos pacientes produce un empeoramiento en la calidad de vida a largo plazo (Patel SG *et al.*, 2018). Protocolos de preservación de órgano, como la estrategia *Watch&Wait* tras neoadyuvancia total en el cáncer de recto, a fin de evitar las secuelas de cirugías extensas, son estrategias a tener en cuenta, más aún, en este subgrupo de pacientes (Peterse EFP *et al.*, 2018).

Los pacientes con tumores rectales localmente avanzados e IMS presentan peor pronóstico y supervivencia global respecto del resto de CCR. Especialmente relevante en los últimos años han sido el desarrollo de ensayos clínicos con la utilización de anticuerpos monoclonales anti-PD1 (Cercek A *et al.*, 2022), con una mejora muy significativa de la supervivencia y su inclusión como primera línea de tratamiento en las guías de práctica clínica de *The National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) desde 2023, para los pacientes con cáncer de recto estadio III e IMS. Es necesario desarrollar ensayos clínicos específicos en este grupo de edad, para el desarrollo de fármacos específicos para las alteraciones moleculares de este grupo de pacientes, así como la consideración de situaciones clínicas especiales en pacientes jóvenes, como la posibilidad de incluir pacientes gestantes o estrategias de preservación de la fertilidad y salud sexual.

Por último, los esfuerzos en el seguimiento a largo plazo de estos pacientes no solo deben ir encaminados al diagnóstico precoz de tumores metacrónicos, sino también al riesgo aumentado de padecer otros tumores no colorrectales en base a su predisposición personal al cáncer y la agresividad de los tratamientos recibidos (por ejemplo, el riesgo aumentado de cáncer de próstata en los pacientes con RT pélvica). Pero también es necesario el seguimiento individualizado de las secuelas del

tratamiento recibido, como la osteoporosis, los trastornos de fertilidad, las secuelas de tratamientos radioterápicos y quirúrgicos agresivos, trastornos mentales, etc.

Dada la importancia que están adquiriendo las diferencias en la localización tumoral, así como las diferencias según la edad al diagnóstico del CCR, en especial en el CCRJ, es preciso profundizar en el estudio de las diversas dimensiones del CCR según su localización y la edad al diagnóstico, lo cual nos permita conocer en mayor profundidad la heterogeneidad de esta enfermedad.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Justificación

El CCR es uno de los tumores más frecuentes, suponiendo la segunda neoplasia diagnosticada en mujeres y la tercera en varones, siendo la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en el mundo. Además, su incidencia se encuentra en aumento, fundamentalmente en el grupo de pacientes jóvenes (menores de 50 años) con un descenso, en contraste, en la incidencia y mortalidad global en los pacientes mayores de dicha edad. En la actualidad, el diagnóstico y el tratamiento del CCR se realiza únicamente en base a criterios anatómicos y de estadificación tumoral, a pesar de la importante evidencia en los últimos años del papel de la biología molecular del tumor y de sus características genéticas en el desarrollo tumoral y la respuesta a los diferentes tratamientos. Por este motivo, el CCR en conjunto debe ser considerado como una enfermedad biológicamente heterogénea, con diferencias clínicas, moleculares y genéticas en base a los diferentes grupos de edad y la localización tumoral. Hasta la fecha, las investigaciones se han dirigido fundamentalmente a los grupos de pacientes con CCR sin criterio de edad. Si bien en los últimos años se están llevando a cabo estudios en el grupo de pacientes jóvenes, dado el aumento en la incidencia y su peor pronóstico general, existe una carencia de este tipo de estudios comparativos con pacientes mayores, en especial a la hora de evaluar las diferencias existentes según la localización tumoral.

En este estudio se realizará una comparativa entre dos series de pacientes con diagnóstico de CCR a edad ≤ 45 años y ≥ 70 años, con estudio de sus características anatómicas (incluyendo localización tumoral), histopatológicas, clínicas, familiares y moleculares, con análisis de las principales vías de carcinogénesis (IMS, IC y CIMP), así como mutaciones en genes MMR y mutaciones en *BRAF*. El objetivo es establecer características diferenciales entre los dos grupos de edad y su localización tumoral, que nos permitan realizar una mejor clasificación y mejorar el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes con diagnóstico de CCR. La consideración de la edad en ambos grupos del estudio es debido a que, en cuanto al grupo joven, se está empezando a reducir el criterio de edad para el *screening* poblacional a los 45 años debido al

aumento de la incidencia del CCRJ. En cuanto al grupo de CCRAT, la definición de mayor de 70 años hace más posible la caracterización del CCR esporádico en global manejado hasta la fecha, en cuanto a no considerar el criterio de edad como factor discriminativo.

2. Hipótesis

El presente estudio plantea como hipótesis que existen diferencias clínicas, histopatológicas y moleculares en el CCR, entre el grupo de pacientes jóvenes y el grupo de pacientes de edad avanzada, según su localización tumoral. La intención de este estudio es establecer una comparativa entre dos poblaciones de pacientes con diagnóstico de CCR a diferente edad (≤ 45 años y ≥ 70 años), que permita identificar diferencias según su localización tumoral, para posteriormente, establecer una clasificación más precisa del CCR, desde el punto de vista molecular.

3. Objetivos

Objetivos generales

Análisis de las características anatomoclínicas, familiares y moleculares de una población de pacientes con CCR de aparición tardía (mayores de 70 años), según su localización tumoral en el colon y realización de un estudio comparativo con los datos del grupo de pacientes jóvenes (menores de 45 años).

Objetivos específicos:

- 1) Descripción de las características clínicas, familiares y anatomopatológicas del CCRAT.
- 2) Descripción de las características moleculares e implicación de las tres vías de carcinogénesis conocidas en el CCRAT.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- 3) Análisis de los resultados en relación con la localización tumoral (colon derecho, colon izquierdo y recto) y correlación con el mecanismo molecular responsable en el CCRAT.
- 4) Estudio comparativo de los resultados obtenidos en el CCR de aparición tardía, con los datos del CCR en pacientes jóvenes publicados previamente en la tesis doctoral “Características diferenciales de las principales vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal de aparición precoz según su localización” (Fernández-Miguel T, 2021) y en el artículo titulado “*Classifying early-onset colorectal cancer according to tumor location: new potential subcategories to explore*” (Perea J et al., 2015).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población de estudio

1.1. Criterios de inclusión y exclusión

Los sujetos del estudio fueron identificados a partir del Registro de Tumores del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. El estudio fue presentado y aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigación I+D del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid.

Fueron incluidos los pacientes con diagnóstico de CCR (adenocarcinoma) a una edad igual o inferior a 45 años e igual o superior a 70 años, desde Enero de 2002 a Diciembre de 2008. De esta forma, se obtuvieron para estudio 88 pacientes consecutivos diagnosticados de CCR a edad ≤ 45 años y 97 pacientes consecutivos a edad ≥ 70 años, con un seguimiento de, al menos, 5 años tras el diagnóstico.

Se excluyeron para el estudio los pacientes con historia personal de síndromes hereditarios predisponentes a CCR (PAF, SL y otros síndromes hereditarios polipósicos), el diagnóstico de EII, así como otras neoplasias colónicas de diferente estirpe anatomopatológica.

1.2. Variables recogidas

De cada uno de los casos incluidos en el estudio se recogió información clínica, familiar y relacionada con el tumor:

1.2.1. Variables clínicas

- Sexo.
- Edad al diagnóstico.

1.2.2. Variables anatomopatológicas

- Localización tumoral:
 - Derecha o proximal: desde el ciego hasta el colon transversal distal.

- Izquierda o distal: desde el ángulo esplénico hasta la unión rectosigmoidea, no incluida.
 - Recto y unión rectosigmoidea.
-
- Grado histológico de diferenciación: bien diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado.
 - Producción de moco (tumor mucinoso) y presencia de células en anillo de sello.
 - Estadío tumoral al diagnóstico, según la clasificación AJCC/TNM.

1.2.3. Variables de evolución de la enfermedad

- Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE).
- Recidiva tumoral.
- Mortalidad a 5 años, relacionada y no relacionada con cáncer.
- Presencia de CCR sincrónico (uno o más CCR diagnosticados en el mismo tiempo que el CCR primario) y/o metacrónico (uno o más CCR diagnosticados al menos 6 meses tras el diagnóstico del CCR primario).
- Presencia de pólipos en colon, en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento; tipo (adenomatosos, hiperplásicos o mixtos) y número.
- Presencia de neoplasias relacionadas con el SL: endometrio, ovario, intestino delgado, estómago, vía biliar, vía urinaria, páncreas, próstata, piel y encéfalo.
- Presencia de otras neoplasias no relacionadas con el SL.

1.2.4. Información familiar

Se contactó telefónicamente con los sujetos incluidos en el estudio con objeto de recopilar información de, al menos, tres generaciones familiares. En caso de fallecimiento del sujeto, se contactó con un familiar de primer grado. En dicha entrevista se informó detenidamente de los objetivos del estudio, se entregó el consentimiento informado del mismo (Anexo 1) y se recogieron los datos referentes a la estructura y antecedentes familiares de enfermedades neoplásicas: número y relación de familiares, edades en el momento de la entrevista, fallecimientos y causa, historia familiar de tumores y edades al diagnóstico de estos.

Según la información obtenida del árbol genealógico de cada sujeto, se clasificaron los pacientes en cuatro grupos:

- Sospecha de SL: casos en los que se cumplen los criterios de Ámsterdam.

- Agregación familiar para neoplasias relacionadas con el SL, independientemente de la presencia o no de neoplasias no relacionadas con el SL: al menos 1 familiar de primer grado o 2 familiares de segundo grado.
- Agregación familiar para neoplasias no relacionadas con el SL: casos que únicamente presentan agregación para dichas neoplasias y al menos dos de ellas en familiares de primer grado.
- Esporádico: casos en los que el paciente sea el único individuo de la familia con diagnóstico de CCR y en los que no existen antecedentes familiares de neoplasias relacionadas y no relacionadas con el SL.

En los casos en los que el estudio de la IMS resultó positivo y/o se cumplían criterios de Ámsterdam para el SL, se volvió a contactar de nuevo para obtener una muestra de sangre periférica para el estudio de posibles mutaciones en los genes MMR más frecuentes: *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*. En el caso de que el sujeto incluido hubiera fallecido, se recogió la muestra del familiar más cercano con diagnóstico de CCR o de una neoplasia relacionada con el SL, obteniendo igualmente el consentimiento informado para el análisis.

2. Muestras

2.1. Tejido tumoral

El análisis tumoral se realizó sobre las muestras guardadas en parafina en el biobanco del Hospital Universitario 12 de Octubre. La mayoría de dichas muestras fueron obtenidas en la intervención quirúrgica del tumor, a excepción de aquellos casos no subsidiarios de cirugía, como los pacientes con diagnóstico de carcinoma *in situ* y los pacientes con tumores irresecables, en los que el material tumoral analizado fue el obtenido en la biopsia endoscópica. El estudio histológico de las muestras fue llevado a cabo por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Antes de la extracción del ADN del tejido parafinado, se determinó la proporción existente de células tumorales y normales en la muestra mediante una tinción con hematoxilina-eosina. Únicamente fueron seleccionadas para estudio directo las muestras con una proporción de células tumorales superior al 70%, para asegurar obtener una cantidad suficiente de ADN tumoral. En los tejidos con una proporción de células tumorales inferior al 70%, se separó el tejido tumoral del sano en dos bloques

distintos. Los procesos para la realización de la tinción con hematoxilina-eosina y para la extracción de ADN del tejido tumoral, se encuentran detallados en el Anexo 2.

2.2. Sangre periférica

En los casos en los que el estudio de la IMS resultó positivo y/o se cumplían criterios de Ámsterdam para el SL, se volvió a contactar de nuevo con los sujetos a estudio o, en caso de fallecimiento, con el familiar más probable afectado de dicha mutación, para obtener una muestra de sangre periférica para el estudio de posibles mutaciones en los genes MMR más frecuentes: *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*.

Para ello se obtuvo una muestra de 15 ml en EDTA y se realizó la extracción de ADN genómico tanto de forma manual, como automatizada, los cuales se encuentran detallados en el Anexo 2.

2.3 Valoración de la cantidad y calidad del ADN obtenido

Tras la finalizar la extracción del ADN es necesario comprobar la cantidad y calidad del mismo. Para ello es necesario realizar una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2%, proceso que se encuentra detallado en el Anexo 2.

3. Estudio de la inestabilidad de microsatélites

3.1. Panel de Bethesda

En la actualidad, el nivel de IMS en tumores sospechosos de SL se determina mediante un panel estándar de marcadores de microsatélites establecido por las guías de consenso del *National Cancer Institute/Bethesda*, el llamado “panel de Bethesda” (Boland CR *et al.*, 1998). Los tumores con alteración en el 30% o mayor en los genes marcados serán considerados con IMS-alta, mientras que aquellos con niveles de alteración inferiores al 30% se considerarán con IMS-baja. De la misma forma, aquellos tumores que no presenten ninguna alteración en el análisis serán considerados como estables desde el punto de vista de los microsatélites (EMS) (Dietmaier W *et al.*, 1997).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Este panel incluye el análisis de cinco microsatélites: BAT25, BAT26, D5S346 (APC), D17S250 (Mfd15CA) y D2S123 (tabla III.1).

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular del Hospital Universitario 12 de Octubre, con la colaboración del Dr. Daniel Rueda. En nuestro estudio, consideramos IMS aquellos casos con IMS-alta, es decir, cuando presenta dentro del panel de Bethesda ≥ 2 loci con inestabilidad. El resto de casos se definieron como EMS.

Tabla III.1. TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y FLUOROCROMOS EMPLEADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA IMS MEDIANTE EL “PANEL DE BETHESDA” (*HNPCC Microsatellite Instability Test*, Roche).

Marcador microsatélite	Localización cromosómica (gen próximo a marcador)	Tamaño del producto de PCR (pb)	Fluorescencia
BAT25	4q12 (c-kit)	110-130	6-FAM
BAT26	2p16.3-p21 (hMSH2)	100-120	TET
D5S346	5q21/22 (APC)	100-130	HEX
D17S250	17q11.2-q12 (BRCA1)	140-170	TET
D2S123	2p16 (hMSH2)	200-230	6-FAM

Pb: pares de bases.

Para el análisis de los microsatélites, se utilizó un ensayo de PCR *multiplex* que genera productos marcados con fluorescencia para poder analizarlos en un secuenciador *ABI* automático (*HNPCC Microsatellite Instability Test*, Roche, Mannheim, Alemania). El protocolo empleado es el recomendado por el fabricante y se encuentra detallado en el Anexo 2. Los resultados generados en el secuenciador *ABI Prism 3700* (PE Applied Biosystems) se visualizan mediante el software *GeneScan 3.5* (figura III.1):

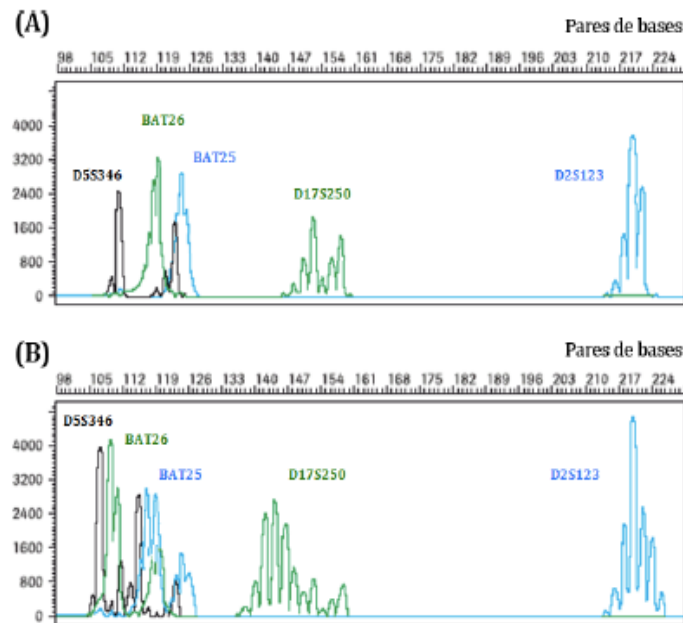


Figura III.1. Resultados del análisis de un ADN normal (A) y de una muestra tumoral clasificada como inestable para todos los marcadores microsatélites analizados (B).

3.2. Estudio molecular de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2* Y *MSH6*)

El análisis de la secuencia de estos genes se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular del Hospital Universitario 12 de Octubre, con la colaboración del Dr. Daniel Rueda.

3.2.1. Estudio de mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*

El estudio de las mutaciones se realizó mediante la electroforesis en geles en gradiente desnaturalizante (Guldborg P y Guttler F, 1993; Makec M *et al.*, 1997) y la PCR descrita por Wijnen J *et al.* (Wijnen J *et al.*, 1995; Wijnen J *et al.*, 1996), añadiendo algunas modificaciones (tablas III.2 y III.3). Por otra parte, cabe destacar dos elementos importantes en la reacción de amplificación: la “pinza CG”, que se une en el extremo 5’ con objeto de estabilizar la doble hebra de ADN y evitar su desnaturalización durante la electroforesis; y la secuencia M13, que se utiliza como molde para la secuenciación de fragmentos con patrones anómalos de migración.

Las secuencias de la “pinza CG” y de M13 son:

- Pinza CG: 5' - CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCC3'
- M13: 5' - GCCAGTCGACGTTGTAAAACGACG - 3'

Tabla III.2. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES EN EL GEN MLH1 (modificado de Wijnen *et al.*, 1995 y Wijnen *et al.*, 1996)

Exón	Cebadores	Tamaño (pb)	Gradiente desnaturalizante
1	(M13) 5' - AGACGTTTCCTTGGCTCTTC - 3' (Pinza CG) 5' - CCGTTAAGTCGTAGCCCTTA - 3'	257	50-70%
2	(Pinza CG) 5' - TTTTCTGTTTGATTGCCAG - 3' (M13) 5' - CGCACAAACATCCTGCTACT - 3'	210	30-50%
3	(Pinza CG) 5' - TGGAAAAATGAGTAACATGATT - 3' (M13) 5' - CAACAGGAGGATATTTTACACA - 3'	255	30-50%
4	(Pinza CG) 5' - TTCCTTTTCTTTTCACTCTATTT - 3' (M13) 5' - TGAATATATATGAGTAAAAGAAGTCAG - 3'	207	30-50%
5	(Pinza CG) 5' - TCTCTCTACTGGATATTAATTTGTT - 3' (M13) 5' - AAGCTTCAACAATTTACTCTCC - 3'	214	30-50%
6	(M13) 5' - CAAGAAAAATCAATCTTCTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - ATGACAAATCTCAGAGACCC - 3'	223	30-50%
7	(M13) 5' - TCTAGTGTGTGTTTTTGGCA - 3' (Pinza CG) 5' - AACAAAACCATCCCCCATAA - 3'	194	30-50%
8	(M13) 5' - AATCCTTGTGTCTTCTGCTG - 3' (Pinza CG) 5' - AAAGATTTTTTTATATAGGTTATCG - 3'	217	30-50%
9	(M13) 5' - CAAAAGCTTCAGAATCTCTTT - 3' (Pinza CG) 5' - TTTCCCATGTGGTTCTTTTT - 3'	233	30-50%
10	(M13) 5' - GGACAGTTTTGAACTGAGTTG - 3' (Pinza CG) 5' - GTCTTGGTTGAGGAGTTTGG - 3'	227	30-50%
11	(M13) 5' - AAGGTAATTGTTCTCTCTATTTT - 3' (Pinza CG) 5' - CACAAGTAGCTGGATGAGAA - 3'	280	30-50%
12	(Pinza CG) 5' - TAATACAGACTTTGCTACCAGGA - 3' (M13) 5' - GGTAGGCTGTACTTTTCCCA - 3'	473	30-50%
13	(Pinza CG) 5' - CTGCACTTCCTTTTCTTCAT - 3' (M13) 5' - CCCTATGCATCCCAGGCA - 3'	270	30-50%
14	(Pinza CG) 5' - TGTTTTTGGTTTTATTTTTTG - 3' (M13) 5' - TCTGCTTGTTACACACTCA - 3'	232	30-50%
15	(Pinza CG) 5' - AATTCAGCTTTTCTTAAAGTC - 3' (M13) 5' - AAATTCAGAAGTGAAAAGGA - 3'	200	30-50%
16	(M13) 5' - CTCCTTCATGTTCTTGCTTC - 3' (Pinza CG) 5' - AGAAGTATAAGAATGGCTGTCA - 3'	280	30-50%
17	(Pinza CG) 5' - TTCCCTTGTCCTTTTCTCCTG - 3' (M13) 5' - CATGTACCGAATGCTTAGTA - 3'	222	30-50%
18	(Pinza CG) 5' - TAAATTCGTACCTATTTTGAGG - 3' (M13) 5' - CCTGGGGTGCCAGTGTGCAT - 3'	251	15-30%
19	(M13) 5' - GGAGGCTTATGACATCTAATG - 3'	300	30-50%

III. MATERIAL Y MÉTODOS

	(Pinza CG) 5' - AAGAACACATCCCACAGTGC - 3'		
--	---	--	--

Pb: pares de bases.

Tabla III.3. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES EN EL GEN MSH2 (modificado de Wijnen <i>et al.</i> , 1995 y Wijnen <i>et al.</i> , 1996)			
Exón	Cebadores	Tamaño (pb)	Gradiente desnaturalizante
1	(M13) 5' - TCGCGCATTTTCTTCAACC - 3' (Pinza CG) 5' - GTCCCTCCCCAGCACGC - 3'	277	50-70%
2	(Pinza CG) 5' - TTGAACATGTAATATCTCAAATCTGT-3' (M13) 5' - AAAGGAAGATAATTACCTTATATGC - 3'	283	15-50%
3	(M13) 5' - TCAAGAGTTTGTTAAATTTTAAAA - 3' (Pinza CG) 5' - CTAGGCCTGGAATCTCCTCT - 3'	421	30-50%
4	(Pinza CG) 5' - TTCCTTTTCTCATAGTAGTTTAAAC - 3' (M13) 5' - TTGTAATTCACATTTATAATCCATG - 3'	280	15-50%
5	(M13) 5' - CCAGATGGTATAGAAATCTTCG - 3' (Pinza CG) 5' - CCATTCAACATTTTAACCCTT - 3'	308	15-30%
6	(M13) 5' - GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT - 3' (Pinza CG) 5' - GCAGGTTACATAAACTAACGAAAG - 3'	277	30-50%
7	(M13) 5' - CATTAATTCAAGTTAATTTATTTCA - 3' (Pinza CG) 5' - AAAACAAAATCACTTGTTACCTTCA - 3'	309	30-50%
8	(M13) 5' - TGAGATCTTTTTATTTGTTTGTTTT - 3' (Pinza CG) 5' - TTTGCTTTTTAAAAATACTACTGC - 3'	263	15-50%
9	(M13) 5' - GGATTTTGTCACTTTGTTCTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - TCCAACCTCCAATGACCCAT - 3'	241	30-50%
10	(M13) 5' - TGGAATACTTTTCTTTTCTTCTT - 3' (Pinza CG) 5' - GCATTTAGGGAATTAATAAGGG - 3'	298	30-40%
11	(Pinza CG) 5' - ATAAACTGTTATTTTCGATTTGCA - 3' (M13) 5' - CCAGGTGACATTCAGAACATT - 3'	227	30-50%
12	(Pinza CG) 5' - TTATTATTCAGTATTCCTGTGTACA- 3' (M13) 5' - CCCACAAAGCCCCAAAAACC- 3'	388	30-50%
13	(Pinza CG) 5' - ATAATTTGTTTTGTAGGCCCC - 3' (M13) 5' - TTTCTATCTTCAAGGGACTAGGAG - 3'	318	30-50%
14	(Pinza CG) 5' - CCACATTTTATGTGATGGGAA- 3' (M13) 5' - CCAATAGTACATACCTTCTTCACC - 3'	370	30-50%
15	(M13) 5' - GTCCCTCACGCTTCCC - 3' (Pinza CG) 5' - AAATATGAAAACAACTGACAAAC - 3'	295	30-50%
16	(M13) 5' - AATGGGACATTCACATGTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - CCATGGGCACTGACAGTTAA - 3'	369	15-30%

Pb: pares de bases.

Para la realización de la PCR se utilizaron los componentes y condiciones detallados en el Anexo 2.

Una vez realizada la PCR, los productos de la misma se sometieron a una electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes, en un sistema *DCode™ Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, California, USA) (Guldberg P y Guttler F, 1993; Makec M *et al.*, 1997). Se describen las modificaciones en las condiciones desnaturalizantes empleadas en nuestro trabajo para cada exón de *MLH1* y *MSH2* en las tablas III.2 y III.3, respectivamente. La electroforesis se realizó con una intensidad de corriente de 17 mA a 65°C durante 18 horas y, posteriormente, fue teñida con bromuro de etidio durante 15 minutos para visualizarla en un transiluminador de luz ultravioleta *GelDoc 2000* (Bio-Rad, California, USA).

Los fragmentos con un patrón de migración anómalo fueron secuenciados empleando como cebador la secuencia complementaria de M13 (tablas III.2 y III.3). La nomenclatura utilizada para la descripción de las variaciones de secuencia identificadas es la recomendada por la Sociedad de Variaciones del Genoma Humano, y se encuentra disponible en <https://www.hgvs.org>.

3.2.2. Análisis de grandes deleciones genómicas en *MLH1* y *MSH2*

Cuando la anomalía consiste en la delección de un gen completo, la secuenciación de este puede resultar enmascarada por la presencia del alelo sano, por lo que es necesario el estudio independiente de las deleciones para conocer los posibles cambios en el número de copias de un gen.

Este análisis se realizó mediante la técnica de amplificación por PCR *multiplex* dependiente de ligación MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). La forma comercial de MLPA para el estudio completo de los exones de los genes *MLH1* y *MSH2* es el *SALSA P003 MLH1/MSH2* (MRC-Holland, Ámsterdam, Holanda), el cual está formado por 43 sondas diferentes, una para cada exón de *MLH1* (19 en total), una para cada exón de *MSH2* (16 en total) y 8 sondas que se utilizan como controles, y que corresponden a otros genes humanos localizados en distintos cromosomas (tabla III.4):

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla III.4. SONDAS UTILIZADAS EN SALSA P003 <i>MLH1</i> / <i>MSH2</i> PARA EL ESTUDIO DE GRANDES DELECCIONES CROMOSÓMICAS EN <i>MLH1</i> Y <i>MSH2</i>				
Longitud (nucleótidos)	Sonda MLPA	Posición cromosómica		
		Control	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>
94	Sonda control sintética	2q14		
130	Sonda control 0797-L0463	5q31		
136	Sonda control 0981-L0566	10p11		
142	Sonda <i>MLH1</i> 0886-L0474		exón 1	
148	Sonda <i>MSH2</i> 1027-L0599			exón 1
154	Sonda <i>MLH1</i> 1008-L0577		exón 2	
160	Sonda <i>MSH2</i> 0906-L0494			exón 2
166	Sonda <i>MLH1</i> 0888-L0476		exón 3	
172	Sonda <i>MSH2</i> 1029-L0601			exón 3
178	Sonda <i>MLH1</i> 0889-L0477		exón 4	
184	Sonda <i>MSH2</i> 0908-L0496			exón 4
193	Sonda control 0976-L0563	11p13		
210	Sonda <i>MLH1</i> 0890-L0478		Exon5	
211	Sonda <i>MSH2</i> 0909-L0497			exón 5
220	Sonda <i>MLH1</i> 0891-L0479		exón 6	
229	Sonda <i>MSH2</i> 0910-L0498			exón 6
238	Sonda <i>MLH1</i> 0892-L0480		exón 7	
247	Sonda <i>MSH2</i> 0911-L0499			exón 7
256	Sonda <i>MLH1</i> 0893-L0481		exón 8	
265	Sonda <i>MSH2</i> 0912-L0582			exón 8
274	Sonda <i>MLH1</i> 0894-L0482		exón 9	
283	Sonda control 0438-L0003	17q21		
292	Sonda <i>MSH2</i> 0913-L0583			exón 9
301	Sonda <i>MLH1</i> 0895-L0483		exón 10	
310	Sonda <i>MSH2</i> 0914-L0584			exón 10
319	Sonda <i>MLH1</i> 0896-L0484		exón 11	
328	Sonda <i>MSH2</i> 0915-L0503			exón 11
337	Sonda <i>MLH1</i> 0897-L0485		exón 12	
346	Sonda <i>MSH2</i> 0916-L0504			exón 12
355	Sonda <i>MLH1</i> 0898-L0486		exón 13	
364	Sonda <i>MSH2</i> 1013-L0575			exón 13
373	Sonda control 0681-L0154	4q25		
382	Sonda <i>MLH1</i> 0899-L0586		exón 14	
391	Sonda <i>MSH2</i> 0918-L0506			exón 14
400	Sonda <i>MLH1</i> 0900-0488		exón 15	
409	Sonda <i>MSH2</i> 0919-L0585			exón 15
418	Sonda <i>MLH1</i> 1009-L0576		exón 16	
427	Sonda <i>MSH2</i> 1053-L0627			exón 16

III. MATERIAL Y MÉTODOS

436	Sonda <i>MLH1</i> 1030-L0602		exón 17	
445	Sonda <i>MLH1</i> 1031-L0603		exón 18	
454	Sonda <i>MLH1</i> 0904-L0492		exón 19	
463	Sonda control 0979-L0568	10p14		
472	Sonda control 0980-L0567	11p12		

Para cada sonda, se indica la longitud en número de nucleótidos y el exón del gen en el que se localiza.

Verde: sonda correspondiente al gen *MLH1*; morado: sonda correspondiente al gen *MSH2*;

negro: sonda de control.

El protocolo utilizado para el análisis se encuentra detallado en el Anexo 2.

3.2.3. Estudio de mutaciones en el gen *MSH6*

El análisis de las mutaciones en el gen *MSH6* se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (dHPLC, *denatured High Performance Liquid Chromatography*) en condiciones parcialmente desnaturizantes, la cual consiste en la retención discriminante de fragmentos de ADN a través de una matriz no porosa, distinguiendo entre fragmentos con complementariedad absoluta (homodúplex) y fragmentos sin ella (heterodúplex).

En primer lugar, se realizó la amplificación de los exones y las regiones intrónicas adyacentes. Para ello, se diseñaron cebadores que cubrieran toda la secuencia codificante del gen (exones) y las regiones adyacentes (tabla III.5) y, posteriormente, fueron comprados a *Sigma-Genosys Ltd* (Sigma-aldrich, Cambridgeshire, Gran Bretaña).

Tabla III.5. PARA CADA EXÓN DEL GEN <i>MSH6</i> , CEBADORES, TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS, TIEMPO Y TEMPERATURA DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR Y TEMPERATURA DE DESNATURALIZACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN					
Exón	Cebadores	Tamaño (pb)	Tiempos PCR	Tª PCR (°C)	Tª dHPLC (°C)
1A	5' - TCCGTCCGACAGAACGGTTG - 3' 5' - TTCGCGTGAGGCCCTGGCCGA - 3'	129	Largo	55	66'0
1B	5' - CGCTGAGTGATGCCAACAAG - 3' 5' - CAACCCCCTGTGCGAGCCTC - 3'	300	Largo	48	67'1

III. MATERIAL Y MÉTODOS

2	5' - AACTAAGTTATGTATTCCT - 3' 5' - CCTGTCTGTCTGTTTCTCTC - 3'	300	Intermedio	55	59'4
3 ^a	5' - GAACTGCTGGGATTACAGGC - 3' 5' - GTATTTACAGGCTTTGCACTG - 3'	130	Corto	63	59'1
3B	5' - CCCAGAAGGGAGGTCATTTT - 3' 5' - CCCCATCACCCCTAACATAAA - 3'	200	Largo	55	58'6
4 ^a	5' - CCAAATTTTGATTTGTTTT - 3' 5' - CCACATCAGAGCCACCAATG - 3'	207	Largo	55	58'3
4B	5' - CGAAGGGTCATATCAGATTC - 3' 5' - ATACCAAACAGTAGGGCGAC - 3'	357	Largo	55	59'0
4C	5' - CGTTAGTGGAGGTGGTGATG - 3' 5' - ATGAATACCAGCCCCAGTTC - 3'	303	Corto	55	58'4
4D	5' - CTGTACCACATGGATGCTCT - 3' 5' - CTTCTCTTTTTCTTTGAGG - 3'	304	Corto	48	58'5
4E	5' - CCTCTGAGAACTACAGTAAG - 3' 5' - CCAAACTGGGAGCCGGGTA - 3'	293	Corto	50	57'1
4F	5' - CTGTTCTCTTCAGGAAGGTC - 3' 5' - AGCCATTGATAAAAGCTCCT - 3'	271	Corto	55	58'5
4G	5' - CCTCAAAAAATGCCTTATTG - 3' 5' - AGCCATTGCTTTAGGAGCCG - 3'	304	Corto	55	56'7
4H	5' - ACTTGCCATACTCCTTTTGG - 3' 5' - TCCAGAGCAGAAAGAAAATC - 3'	299	Corto	48	57'7
4I	5' - CTACATACAGCAAGAAGAAG - 3' 5' - CCTGCTTTGGGAGTAATAAG - 3'	253	Largo	55	56'0
4J	5' - GAAAAGGCTCGAAAGACTGG - 3' 5' - TCGTTTACAGCCCTTCTTGG - 3'	230	Corto	45	59'1
4K	5' - GAAGAATACGACTTGAAATC - 3' 5' - GCACTACTTATCAAAGCCTG - 3'	244	Corto	46	57'6
5 ^a	5' - AAAACCCCCAAACGATGAAG - 3' 5' - GTCTTCGTAATGCAAGGATG - 3'	220	Corto	60	59'2
5B	5' - CTTAGAGCTTAAAGGATCAC - 3' 5' - CTTTCTGATAACAAAACCTT - 3'	208	Largo	54	57'1
6	5' - CTTTATGAACTGTACTACC - 3' 5' - GCAAATATCTTTATCACAT - 3'	237	Corto	50	56'6
7	5' - GAGTATTCATTTGTGATTTT - 3' 5' - AAATGTTTTTAAGATAGATGCTTC - 3'	171	Corto	50	53'7
8	5' - CCTTTTTGTTTTAATTCCT - 3' 5' - CAAGAGAAGTGCCCTCTCAA - 3'	268	Corto	50	56'4
9	5' - TTTTGAGAGGGCACTTCTCT - 3' 5' - CCCCTTTTACTGTTTCTTG - 3'	266	Corto	50	57'0

III. MATERIAL Y MÉTODOS

10	5' - ATTTAAGGGAAGTTTGCC - 3' 5' - GTTTATTAGATCATAATGTT - 3'	165	Largo	50	57'4
----	--	-----	-------	----	------

Pb: pares de bases; dHPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

Posteriormente, se realizó la mezcla de la PCR, incluyendo los elementos y el protocolo detallados en el Anexo 2.

La evaluación del estado mutacional se realizó mediante la dHPLC, utilizando el sistema *WAVE®* (Transgenomic, Gran Bretaña) (figura III.6), basado en la cromatografía de intercambio iónico en fase reversa, con posterior detección ultravioleta. La fase estacionaria se realizó con una matriz no porosa de bolsas poliméricas de poliestireno-divinilbenceno recubiertas de cadenas de 18 carbonos (C-18) que forman puentes C-C, mientras que la fase móvil consistió en una combinación de tampones que extraen el ADN de la columna, TEAA (acetato de trietilamonio) 0.1M y acetonitrilo al 25%.

Los fragmentos de ADN pasan por un detector ultravioleta a medida que van saliendo de la columna, de manera que el software *Navigator™* (*WAVE®*, Transgenomic, Gran Bretaña) lo representa en forma de picos (figura III-2):

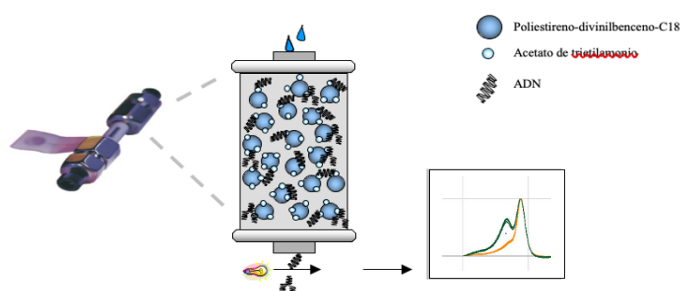


Figura III.2. Esquema representativo de una columna del sistema *WAVE®*. La fase estacionaria es una matriz de bolas de poliestireno-divinilbenceno-C18, a la que se une el acetato de trietilamonio y posteriormente los fragmentos de ADN. La columna se encuentra incluida en un horno que permite trabajar en condiciones desnaturalizantes. Al pasar los fragmentos de ADN por un detector ultravioleta, se obtiene una representación en forma de picos.

A concentraciones mayores de acetonitrilo, la interacción hidrofóbica entre la matriz y el ADN/TEAA se va debilitando y los fragmentos comienzan a salir de la columna, en primer lugar, los heterodúplex y, posteriormente, los homodúplex (figura III.3):

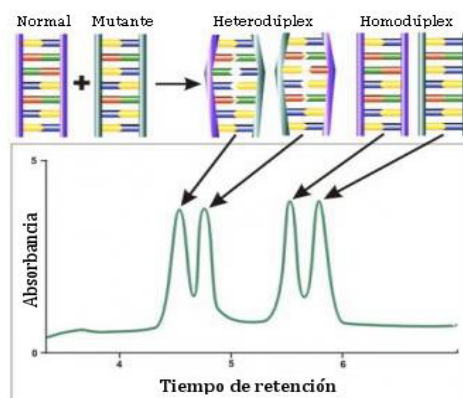


Figura III.3. Ejemplo de análisis de las mutaciones en el gen *MSH6* mediante cromatografía de alta resolución (dHPLC). El tiempo de retención varía según la interacción matriz-ADN/TEAA, de forma que se visualizará, en primer lugar, los fragmentos de ADN heterodúplex y, posteriormente, los homodúplex. Imagen modificada de www.transgenomics.com.

Por último, todos los productos de la PCR en los que se detectaron variantes mediante la técnica de dHPLC fueron secuenciados con el objeto de definir si se trataba de una variante polimórfica o de una mutación. Para ello se purificaron los productos de la PCR con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics GmgH, Mannheim, Alemania) y, posteriormente, se secuenciaron utilizando el sistema *ABI Prism* (Applied Biosystems, USA) de terminadores fluorescentes *Big Dye™* y un secuenciador multicapilar *ABI 3.700*, siendo analizados con el software *GeneScan 3.5* (PE Applied Biosystems). Fueron secuenciados aquellos fragmentos con cromatogramas anómalos sugestivos de heterodúplex “alelo normal-alelo mutado” u homodúplex “alelo mutado-alelo mutado”.

3.2.4. Estudio de la hipermetilación del promotor del gen *MLH1*

Para el estudio de la hipermetilación en línea germinal del promotor del gen *MSH1* se realizaron algunas modificaciones en los protocolos descritos previamente (Herman JG *et al.*, 1998; Sutter CM, Martin DI y Ward RL, 2004). Como controles positivos para hipermetilación del promotor de *MSH1* se utilizaron las líneas celulares RKO y SW48, las cuales se caracterizan por presentar hipermetilación del promotor del gen *MLH1* en ambos alelos e IMS, con ausencia de mutación en los genes MMR. Como control negativo se utilizó sangre periférica de un individuo sano.

Se considerarán positivos para hipermetilación en el promotor de *MSH1* aquellas muestras con los tres protocolos para su detección positivos:

A. Modificación con bisulfito sódico:

El objeto de esta técnica se basa en la capacidad del bisulfito sódico para transformar las citosinas que no se encuentran previamente metiladas en uracilos, por lo que aquellas con presencia de metilación permanecerán intactas (Wang Y *et al.*, 2003). Si se amplifica y secuencia el ADN modificado, se obtendrá el estado de metilación de todas las islas CpG. El protocolo de esta técnica se encuentra detallado en el Anexo 2.

B. PCR específicas de presencia o ausencia de metilación:

Para su realización se utilizaron las secuencias de los cebadores descritas previamente (Herman JG *et al.*, 1998) y se adquirieron a través de *Sigma-Genosys Ltd* (Cambridgeshire, Gran Bretaña).

Las secuencias utilizadas para los cebadores de metilación fueron:

- Sentido: 5' - ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC - 3'
- Antisentido: 5' - CCTCATCGTAACTACCCGCG - 3'

Las secuencias utilizadas para los cebadores de ausencia de metilación fueron:

- Sentido: 5' - TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT - 3'
- Antisentido: 5' - ACCACCTCATCATAACTACCCACA - 3'

El protocolo y las condiciones para la realización de la mezcla de las PCR específicas de presencia o ausencia de metilación se encuentran detalladas en el Anexo 2.

C. PCR no específicas del estado de metilación:

En este caso, la secuencia del promotor estudiada no contiene islas CpG por lo que se amplificarán tanto los casos con metilación de las islas CpG, como aquellos sin ella. La secuencia utilizada para los cebadores también es la descrita en estudios previos (Herman JG *et al.*, 1998):

- Sentido: 5' - GAGTAGTTTTTTTTTTAGGAGTGAAG - 3'

- Antisentido: 5' - AAAA ACTATA AAA ACCCTATACCTAATCTA - 3'

El protocolo y las condiciones para la realización de la mezcla de las PCR no específicas del estado de metilación se encuentran detalladas en el Anexo 2.

D. Secuenciación:

Por último, el producto no digerido fue purificado para su posterior secuenciación. Los fragmentos fueron purificados con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), posteriormente, fueron sometidos a electroforesis de alta resolución en un secuenciador *ABI PRISM® 3700* (PE Applied Biosystems) y, por último, fueron analizados con el software *GeneScan 3.5* (PE Applied Biosystems) (figura III.9):

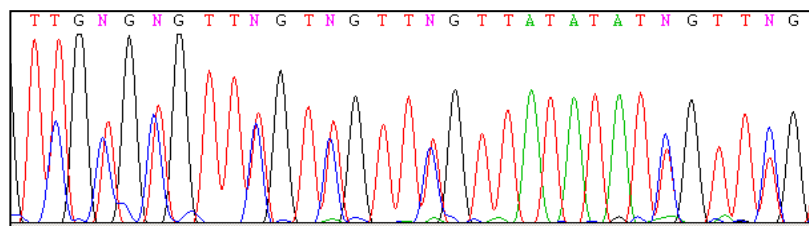


Figura III.4. Ejemplo de la secuenciación de un caso positivo para hipermetilación del promotor del gen *MLH1* en uno de sus alelos. Cuando no existe metilación de las islas de CpG, tras la modificación con bisulfito las citosinas se transforman, por lo que en la secuencia el pico corresponderá en su totalidad a una timina (rojo). Sin embargo, cuando uno de los alelos del promotor está metilado se observan dos picos superpuestos de citosina (azul) y timina (rojo).

3.3. Estudio inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de errores de ADN (MLH1, MSH2, MSH6)

El análisis inmunohistoquímico de las proteínas MLH1, MSH2 y MSH6 se utiliza para identificar posibles casos de portadores de mutación en los genes MMR, si bien su alteración por sí sola no constituye un criterio suficiente para considerar a un individuo como portador de mutación, siendo necesarios otros criterios como la presencia de IMS y los criterios clínicos de Ámsterdam o Bethesda (Salahshor S *et al.*, 2001; Lindor NM *et al.*, 2002; Wahlberg SS *et al.*, 2002; Hampel H *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, el análisis inmunohistoquímico de las proteínas MLH1, MSH2 y MSH6 se llevó a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre por la Dra. Yolanda Rodríguez. Los clones y diluciones utilizados aparecen reflejados en la tabla III.6. El proceso se encuentra detallado en el Anexo 2.

Los casos a estudio se consideraron positivos o negativos según la presencia o ausencia de expresión de las proteínas.

Tabla III.6. CLONES, MARCA COMERCIAL Y DILUCIÓN UTILIZADA PARA EL ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS PROTEÍNAS MLH1, MSH2 Y MSH6				
Proteína	Clon	Proveedor	Dilución	Desenmascaramiento
MLH1	G168-15	BD PharMingen	1:50	Tris-EDTA, PH 9
MSH2	FE11	Oncogene	1:50	Tris-EDT, PH 9
MSH6	44	BD Transduction Lab	1:50	Na ₃ C ₃ H ₅ O (COO) ₃ , PH 5.6

4. Estudio de la inestabilidad cromosómica mediante arrays de CGH (*Comparative Genomic Hybridisation*)

Este estudio fue realizado con la colaboración del Dr. Juan Luis García, integrante del departamento de Genética Molecular en Onco-Hematología del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

Para el análisis de la IC en primer lugar es necesario cuantificar el ADN disponible en la muestra para que los resultados sean valorables. La cantidad de ADN fue medida con el espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). El objetivo de la hibridación genómica comparada (CGH) es identificar alteraciones en el número de copias (CNA, *Copy Number Alterations*), la cual se realiza mediante microarrays de oligonucleótidos (Roche NimbleGen, Inc., Reykjavik, Islandia). Para ello se utilizaron como muestras de referencia *Human Genomic DNA Male G1471/ Female G1521* (Promega Corporation, Madison, USA), utilizando el kit *NimbleGen Dual-Colon DNA Labelling* (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) para el marcaje de las muestras control y problema. Los microarrays utilizados permiten la

determinación simultánea de 12 pares de muestras independientes y contienen 135.000 sondas isotérmicas, que abarcan por completo el genoma humano, con una longitud aproximada de 45-75 bases (figura III.5):

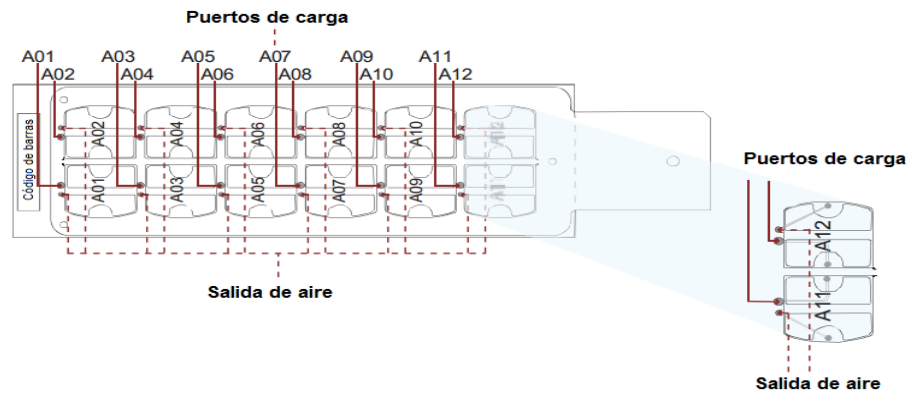


Figura III.5. Estructura de una placa de microarray CGH para el análisis de la IC (formato 12x135, Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia).

El procedimiento para la hibridación se encuentra detallado en el Anexo 2.

Cada región genómica que exhibía un cambio en el número de copias se examinó utilizando la aplicación *UCSC genoma* (<http://genome.ucsc.edu/>), para determinar la ubicación y la importancia del cambio.

El grado de inestabilidad genómica para cada tumor se estimó determinando la fracción alterada de cada genoma. Este índice se calculó de dos formas:

- Se computó como la fracción de oligos alterados, donde el valor correspondiente a cada segmento se utilizó para determinar el estado alterado de cada oligo.
- Se calculó como la fracción de genoma alterado basado en el número de fragmentos normalizados de cada caso.

Posteriormente, todos los segmentos analizados fueron comparados con el valor normalizado de segmentos alterados, para definir su estado GNL (*Gain, Normal, Loss*).

El Índice de Inestabilidad Genómica (IIG) representa para cada caso la fracción de genoma aberrante y se calcula teniendo en cuenta todos los segmentos que no se encuentran en un estado de GNL normal, con la siguiente fórmula matemática:

$$GII^{total} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i \neq 0) = 1 - \frac{1}{n \sum_{i=1}^n (x_i = 0)}$$

n: número total de brazos cromosómicos estudiados.

X_i: datos obtenidos para cada segmento.

Por otra parte, el IIG total se puede descomponer en distintas fracciones para el cálculo de la porción de genoma por cada tipo de aberración (ganancia o pérdida), únicamente cambiando la etiqueta $x_i \neq 0$ por $x_i = +1$ y $x_i = -1$, respectivamente:

$$GII^{ganancias} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i = +1)$$

$$GII^{pérdidas} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i = -1)$$

n: número total de brazos cromosómicos estudiados.

X_i: datos obtenidos para cada segmento.

Se consideraron cromosómicamente estables aquellos tumores con menos de un 20% de segmentos alterados, definiendo como MACS los tumores con 1-4 cromosomas inestables y EMS.

Por último, para establecer un perfil de inestabilidad de las muestras estudiadas se realizaron curvas de frecuencia de IC y la descripción de las CNV (*Copy Number Variation*) o de las regiones cromosómicas recurrentemente alteradas, calculando la cifra promedio alteración en cada tumor y en la muestra completa. Estas alteraciones fueron trasladadas a cada localización tumoral con el fin de establecer patrones específicos de las mimas en cada localización (colon derecho, colon izquierdo y recto) y, en aquellos casos estadísticamente significativos, presuponer una vía de carcinogénesis específica de dicha localización.

5. Estudio del fenotipo metilador de islotes CpG (CIMP)

Para el análisis del CIMP es necesario estudiar el estado de metilación de un panel formado por los genes: *CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1* (Ogino S *et al.*, 2006).

Se define como CIMP-alto la presencia de metilación en ≥ 6 promotores de los genes estudiados, CIMP-bajo la presencia de 1 a 5 promotores metilados y CIMP-0 la ausencia de metilación (Ogino S *et al.*, 2007).

Para el análisis de la metilación en los promotores de los genes estudiados se utilizó la técnica MS-MLPA (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Nygren AO *et al.*, 2005) y utilizando nuevamente el kit *SALSA MLPA* (ME042-B1, MRC-Holland). El producto resultante de este análisis fue sometido a una electroforesis capilar en un analizador *3100-Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) y su lectura en forma de picos se realizó usando el software *Genemapper* v3.5. Por último, se calculó el índice de metilación total dividiendo el área de una sonda digerida HhaI y su equivalente no-digerido.

Como se comentado previamente, una vez analizado el CIMP podemos subdividir las muestras en los 4 subtipos de consenso molecular (SCM) de la clasificación molecular, definiéndose un quinto grupo posible con EMS y estabilidad de cromosomas (MACS):

- IMS-CIMP-alto.
- IMS-CIMP bajo/0.
- EMS-CIMP-alto.
- EMS-CIMP bajo/0.
- MACS.

6. Estudio del estado mutacional de *BRAF*

Para el estudio de las mutaciones en *BRAF* se analizó la región V600E del exón 15, la cual es responsable de más del 90% de las mutaciones en este gen. Para su análisis se utilizó HRM (*High Resolution Melting*) en el sistema *LightCycler® 480 de Roche* (Roche Diagnostics). Los *primers* fueron diseñados siguiendo las indicaciones del sitio *NCBI Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), utilizando las secuencias:

- Sentido: 5'- AATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGA - 3'.
- Antisentido: 5'- GCAGCATCTCAGGGCCAAAA - 3'.

La mezcla de la PCR y las condiciones para su análisis se encuentran detalladas en el Anexo 2.

7. Estudio de variantes somáticas mediante NGS (*Next Generation Sequencing*)

La metodología empleada para el estudio de posibles variantes somáticas en los tumores fue la NGS usando el secuenciador *Ion PGM™ System* (Thermo Fisher Scientific Inc.) y un panel comercial, *Ion Ampliseq™ Cancer Hotspot Panel v2* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Este panel contiene regiones *hotspot* de 50 genes implicados en cáncer (Tabla III.7) y se compone de 207 parejas de *primers* incluidos en un *pool* que amplifican fragmentos de ADN (amplicones) de un tamaño entre de 111-187 pb (media: 154 pb). El proceso se encuentra detallado en el Anexo 2.

Tabla III.7. Listado de genes incluidos en el panel de NGS				
<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>APC</i>	<i>EZH2</i>	<i>HRAS</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ATM</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK3</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IDH2</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CSF1R</i>	<i>FLT3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>GNA11</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>

Tras la secuenciación, se realizó un análisis bioinformático revisando los resultados mediante *Torrent Suite™ Software* (Thermo Fisher Scientific Inc.), se estudió datos técnicos tales como la densidad y uniformidad de la carga y el tamaño de los fragmentos o la cobertura conseguida. Utilizando ese mismo *software*, se llevó a cabo un análisis denominado *alignment* por el que las secuencias obtenidas fueron alineadas frente al genoma de referencia humano (hg19) obteniéndose los archivos *.bam* y *.bam bai*. Y se realizó un proceso llamado *variant calling (somatic)* con el fin de obtener una aproximación de las variantes, SNV o indels, detectadas en cada muestra. En este análisis, se incluye un filtrado a nivel técnico que descarta secuencias con valores de calidad menores a Q20, el cual es el límite que admite una base nucleotídica errónea cada 100 bases. Tras este proceso se obtuvieron los archivos *.vcf*. Este último archivo se transfirió a *Ion Reporter™ Software* (Thermo Fisher Scientific Inc.) generando archivos equivalentes en formato *.xls* que contienen

las variantes alélicas detectadas junto con parámetros relevantes e información de diferentes bases de datos y predictores *in silico* (Tabla III.8):

Tabla III.8. Fichero obtenido tras el análisis bioinformático utilizando <i>Torrent Suite™ Software</i> e <i>Ion Reporter™ Software</i> (Thermo Fisher Scientific Inc.).	
Parámetros	Descripción
Run	Run ID
Sample	Sample ID
Barcode	Barcode ID
Locus	Variant genomic position (hg19)
Genotype	Sample genotype
Ref	Reference allele
Type	Type of variant (SNV/insertion/deletion)
No Call Reason	No Call Reason
Genes	Gene official name
Location	Variant position (exonic, intronic, utr5, utr3 ...)
Length	Variant length
Variant ID	Variant ID
Variant Name	Variant Name
% Frequency	Frequency of the allele observed from the raw data
Strand	Sense of the strand (+/-)
Exon	Exon affected by the variant
Transcript	RefSeq Transcript
Coding	Nucleotide affected by the variant
Amino Acid Change	Aminoacid affected by the variant
Variant Effect	Variant effect on the transcript
PhyloP	Pathogenicity predictor based on evolutionary conservation
SIFT	Pathogenicity predictor based on sequence homology and physical properties of amino acids
Grantham	Pathogenicity predictor based on distance between two amino acids, in an evolutionary sense
PolyPhen	Pathogenicity predictor based on the impact produced by the change of amino acids in the structure and function of the protein
PFAM	Database of protein families that includes multiple sequence alignments generated using hidden Markov models
dbSNP	Database for human single nucleotide variations, microsatellites, and small-scale insertions and deletions
DGV	Database of Genomic Variants
MAF	Minor Allele Frequency (1000 Genomes, dbSNP database)
EMAF	Minor Allele Frequency (5000Exomes EuropeanAmerican MAF)
AMAF	Minor Allele Frequency (5000Exomes AfricanAmerican MAF)
GMAF	Minor Allele Frequency (5000Exomes Global MAF)
UCSC Common SNPs	Variants that are included in the UCSC Genome Browser Common SNPs database
COSMIC	Expert-curated database of somatic mutations in human cancer
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man® database
Gene Ontology	Database that contents information of functions of specific genes
DrugBank	List of drugs known to target the gene affected by the variant
ClinVar	The impact values of the variant that observed in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) ClinVar database
Allele Coverage	Number of reads supporting the called allele
Allele Ratio	Non reference allele frequencies
p-value	Statistical confidence of that call
Phred QUAL Score	Quality score of the identification of the nucleobases generated by automated DNA sequencing
Coverage	Total of number of reads
Ref+/Ref-/Var+/Var-	Number of reference reads and number of variant reads
Homopolymer Length	Specified homopolymer length

Partiendo de cada uno de los ficheros anotados con las variantes correspondientes en formato .xls e identificados mediante el código de la muestra y el paciente, además de los datos relativos a la carrera (barcode y run), se realizó una unificación en un solo archivo.

La priorización de variantes parte de ese único fichero, aplicando como primer criterio la eliminación de las variantes que poseían una frecuencia alélica (VAF: *variant allele frequency*) inferior a 8% considerándose como posibles artefactos formados durante el procedimiento. El siguiente filtro consistió en descartar aquellas variantes presentes en una frecuencia superior a 1% en la población general (MAF: *minor allele frequency*) como posibles polimorfismos, donde se utilizaron diferentes bases de datos (Tabla III.9). Después, se realizó la selección de variantes localizadas en los genes claramente relacionados con CCR. El siguiente filtro consistió en seleccionar las variantes que afectaban a regiones codificantes en función del efecto de la variante (*nonsense, frameshift insertion, frameshift deletion, stop loss, missense, nonframeshift insertion, nonframeshift deletion, synonymous*), priorizando en aquellas que claramente alteran la funcionalidad. A continuación, se realizó un cribaje manual visualizando las variantes susceptibles de ser relacionadas con la enfermedad mediante el software *Integrative Genomics Viewer* (IGV; Broad Institute). Así como su evaluación a través de múltiples bases de datos (Tabla III.9), predictores *in silico* (Tabla III.10) o búsqueda de información en la literatura científica (Li et al., 2017).

Tabla III.9. Bases de datos o recursos relevantes para la interpretación de variantes. BD: Base de datos (Modificado de Li et al., 2017).		
Tipo de BD	BD	Enlace web
BD poblaciones	1000 Genomes Project	http://browser.1000genomes.org
	Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS
	dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
	dbVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
	ExAC	http://exac.broadinstitute.org
	gnomAD	https://gnomad.broadinstitute.org
BD de patologías o mutaciones útiles para la interpretación de variantes genómicas en cáncer	ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.org
	Leiden Open Variation Database	http://www.lovd.nl
	InSiGHT	https://www.insight-group.org/variants/databases/
	dbNSFP	https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
	Ensemble Variant Effect Predictor	http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html
BD específicas de cáncer	OMIM	https://www.omim.org
	Catalog of Somatic Mutations in Cancer	http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	My Cancer Genome	http://www.mycancergenome.org

III. MATERIAL Y MÉTODOS

	Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center	https://pct.mdanderson.org
	cBioPortal	http://www.cbioportal.org
	Intogen	https://www.intogen.org/search
	ClinicalTrials.gov	https://clinicaltrials.gov
	IARC (WHO) TP53 mutation database	http://p53.iarc.fr
	Pediatric Cancer Genome Project	http://explorepccgp.org
	International Cancer Genome Consortium	https://dcc.icgc.org
Repositorios de secuencias y servidores de datos e información	NCBI Genome	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome
	RefSeqGene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg
	Locus Reference Genomic	http://www.lrg-sequence.org
	UCSC table browser	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables
	Ensemble BioMart	http://useast.ensembl.org/biomart/martview
	Varsome The Human Genomics Community	https://varsome.com
	Pubmed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Tabla III. 10. Algoritmos computacionales de predicción del impacto funcional (predictores *in silico*) provocado por variantes genómicas. *SNV: single nucleotide variants* (Modificado de Li *et al.*, 2017).

Tipo de predictores	Predictores	Enlace web
<i>Missense SNV</i>	PolyPhen	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	SIFT	http://sift.jcvi.org
	MutationAssessor	http://mutationassessor.org
	MutationTaster	http://www.mutationtaster.org
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php
	Condel	http://bg.upf.edu/blog/2012/12/condel-for-prioritization-of-variants-involved-inhereditary-diseases-and-transfoc-for-cancer
	CADD	http://cadd.gs.washington.edu
	GERP++	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html
	PhyloP and PhastCons	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast
<i>Splice site</i>	Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF
	MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
	NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2
	NNSplice	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
	GeneSplicer	http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_splice.shtml
	SplicePort	http://spliceport.cbcb.umd.edu/

Para la interpretación de las variantes somáticas se tuvo en cuenta su impacto en la clínica (Tabla III.11) y se consideró su actuación como posible biomarcador terapéutico, de diagnóstico o pronóstico (Li et al., 2017).

Tabla III. 11. Evidencias clínicas para la interpretación de variantes somáticas. <i>FDA: Food and Drug administration</i> (Li et al., 2017).
Variantes patogénicas - fuerte evidencia clínica
Existen terapias aprobadas por la FDA Variantes incluidas en las guías profesionales Evidencias fuertes en múltiples estudios consensuadas por expertos
Variantes probablemente patogénicas - potencial evidencia clínica
Existen terapias para diferentes tipos de cáncer aprobados por la FDA o actualmente hay ensayos clínicos Evidencias consensuadas en múltiples estudios Hay ensayos pre-clínicos o existen algunos casos reportados aún sin consenso
Variantes inciertas - evidencia clínica desconocida
La frecuencia alélica no es relevante ni en las bases de datos de población general ni en las específicas de cáncer No hay evidencias suficientes publicadas que muestren la asociación con el cáncer
Variantes benignas o probablemente benignas
La frecuencia alélica es alta en la población general o sub-poblaciones de adultos sanos No existen evidencias publicadas que muestren la asociación con el cáncer

Los genes que componían el panel de NGS estudiado fueron agrupados por vías de señalización basándonos en datos de la literatura científica y en herramientas que nos permitieron registrar las redes de interacción molecular como *Gene Ontology* (GO) (Consortium et al., 2000) o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Kanehisa and Goto, 2000). En esta dirección, las vías de señalización se agruparon según los procesos celulares que regulan en supervivencia celular (TGF- β , MAPK, STAT, PI3K, RAS, Ciclo celular/Apoptosis), destino celular (NOTCH, Hedgehog, WNT, modificación de la cromatina, regulación transcripcional) y mantenimiento del genoma (control del daño en el ADN) (Tabla III.12) (Vogelstein et al., 2013).

En la evaluación, se comparó tanto las vías de señalización alteradas como los procesos celulares afectados en el tumor inicial y en el tumor metacrónico.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla III. 12. Listado de genes que componen el panel de NGS agrupados por vías funcionales y procesos celulares.		
Procesos celulares	Vías de señalización	Genes
Supervivencia celular	Ciclo celular / Apoptosis	<i>ABL1</i>
		<i>CDKN2A</i>
		<i>NPM1</i>
		<i>RB1</i>
	PI3K	<i>AKT1</i>
		<i>PIK3CA</i>
		<i>PTEN</i>
	PI3K; RAS	<i>ALK</i>
		<i>CSF1R</i>
		<i>EGFR</i>
		<i>ERBB2</i>
		<i>ERBB4</i>
		<i>MET</i>
		<i>PDGFRA</i>
	PI3K; RAS; STAT	<i>RET</i>
		<i>FGFR1</i>
		<i>FGFR2</i>
		<i>FGFR3</i>
		<i>FLT3</i>
	PI3K; RAS; MAPK	<i>KIT</i>
		<i>VHL</i>
		<i>GNA11</i>
	PI3K; RAS; MAPK; STAT	<i>GNAQ</i>
		<i>KDR</i>
	RAS	<i>SRC</i>
		<i>BRAF</i>
		<i>HRAS</i>
		<i>KRAS</i>
		<i>NRAS</i>
Destino celular	WNT	<i>PTPN11</i>
		<i>JAK2</i>
		<i>JAK3</i>
	Hedgehog	<i>MPL</i>
		<i>SMAD4</i>
	Modificación de la cromatina	<i>TGF-β</i>
		<i>GNAS</i>
		<i>APC</i>
		<i>CDH1</i>
	mTOR	<i>CTNNB1</i>
		<i>HNF1A</i>
Mantenimiento del genoma	NOTCH	<i>SMO</i>
		<i>EZH2</i>
	Control daño en el ADN	<i>IDH1</i>
		<i>IDH2</i>
	Ciclo celular / Apoptosis; Control daño en el ADN	<i>SMARCB1</i>
		<i>STK11</i>
		<i>FBXW7</i>
		<i>NOTCH1</i>
		<i>ATM</i>
		<i>MLH1</i>
		<i>TP53</i>

8. Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo, las variables cualitativas fueron expresadas por el número de casos (n), así como por el porcentaje con respecto al total de casos de la variable en cuestión. Las variables cuantitativas fueron expresadas mediante la media y la desviación estándar (DS).

Para el análisis comparativo de las características clínicas, anatomopatológicas, familiares, genéticas e inmunohistoquímicas, se utilizaron la *prueba de Chi cuadrado* (χ^2) *de Pearson* para variables categóricas o el *test exacto de Fisher* (test no paramétrico).

En cuanto al análisis de las variables de evolución de la enfermedad, las medias de las edades de aparición (variables continuas) se compararon mediante el *test de T de Student* para muestras independientes y la *prueba estadística de ANOVA* cuando se compararon variables continuas de más de dos categorías. Para el análisis de la supervivencia libre de recidiva se empleó el *test de T de Student* y para el análisis de supervivencia global el *test de Kaplan-Meier*.

Para el análisis de CGH las regiones mínimas se codificaron como -1 (pérdidas), 0 ó 1 (ganancias), para la búsqueda de significación se empleó el análisis univariante y multivariante, considerando la localización tumoral en todos los casos y empleando *R Statistical Software*® (prueba de Levene de igualdad de varianzas).

Para la realización de estas pruebas se utilizó el programa estadístico *SPSS v.20.0 para Windows* (Chicago, Illinois, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de *p* fue menor de 0.05.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Resultados en pacientes con CCR de aparición tardía

1.1. Resultados globales del grupo de CCRAT

Fueron incluidos para estudio 97 pacientes consecutivos con edad ≥ 70 años con diagnóstico de CCR (adenocarcinoma). Si bien la muestra inicial fue de 97 pacientes, no se pudieron realizar estudios anatomopatológicos o moleculares en algunos de los casos, bien porque sólo se disponía de material de la biopsia tumoral (generalmente en las presentaciones en estadio IV) o bien porque tras la realización de las distintas técnicas no quedaba disponible más material tumoral. Por ello, los porcentajes de las distintas características varían sobre el total de los pacientes estudiados, como además se indica en las correspondientes tablas.

Los resultados globales del grupo de CCRAT se encuentran resumidos en las tablas IV.1 y IV.2 y han sido parcialmente publicados en el artículo “*Differential clinicopathological and molecular features within late-onset colorectal cancer according to tumor location*” (Brandariz L *et al.*, 2018) (Anexo 3).

1.1.1. Características clínicas y de seguimiento

De los 97 pacientes incluidos, la edad media al diagnóstico fue de 77.92 años (DE 5.73), de los cuales 50 pacientes (51.5%) eran varones y 47 pacientes (48.5%) eran mujeres.

El análisis de la SLE objetivó una media de 21.68 meses (DE 22.33). La SG fue de 69.83 meses (desviación estándar (DE) 11.23). La presencia de recidiva tumoral durante el seguimiento se objetivó en el 14.3% de los pacientes. La mortalidad a 5 años global, relacionada y no relacionada con cáncer, fue del 30.9%.

Es llamativa la importante asociación de pólipos previos al diagnóstico o durante el seguimiento, siendo evidenciados en el 63.9% de los pacientes, con un número medio de pólipos diagnosticados de 2.7 (DE 4.67), de los cuales los pólipos adenomatosos fueron predominantes (61.3%), con un 9.7% de pólipos hiperplásicos y un 29% de pólipos mixtos.

De los 97 pacientes, 33 (34%) fueron diagnosticados de neoplasias primarias múltiples, diferentes de CCR, con un total de 18 tumores: 4 adenocarcinomas de próstata (22.22%), 4 adenocarcinomas gástricos (22.22%), 2 carcinomas de endometrio (11.11%) y 1 caso de micosis fungoide, melanoma, ovario, sarcoma de Ewing, cáncer de riñón de células claras, leucemia linfática crónica, cáncer de pulmón, y tumor carcinoide gástrico. La presencia de CCR sincrónico y/o metacrónico se evidenció en un total de 21 pacientes (21.6%) (tabla IV.1).

1.1.2. Características familiares

En cuanto a los antecedentes familiares, 12 pacientes (12.4%) presentaron historia familiar de neoplasias relacionadas con SL, de los cuales 1 paciente presentaba criterios de Ámsterdam para el diagnóstico de SL, si bien éste no se confirmó finalmente ni por determinación de IMS ni por la inmunohistoquímica de las proteínas de genes MMR. Los principales tumores agregados, relacionados con SL, fueron: CCR (38.1%), cáncer gástrico (23.81%), cáncer de ovario (9.52%), cáncer de páncreas (9.52%), cáncer de útero (4.76%), cáncer de vejiga (4.76%), cáncer de vesícula biliar (4.76%) y tumor cerebral (4.76%).

En 6 pacientes existían antecedentes familiares de neoplasias no relacionadas con SL (6.2%). Los tumores asociados fueron: cáncer de mama (36.36%), cáncer de próstata (18.18%), cáncer de pulmón (18.18%), hepatocarcinoma (9.1%), linfoma (9.1%) y cáncer labial (9.1%). El cáncer de mama y de próstata fueron considerados como neoplasias no relacionadas con el SL, aunque estudios recientes parecen indicar un aumento de su riesgo y relación en los pacientes con este síndrome. Por el contrario, como era esperable en este grupo de edad, el 80.4% de los pacientes no presentaron antecedentes familiares de neoplasias relacionadas y no relacionadas con SL, siendo diagnosticados de CCR de tipo esporádico (tabla IV.1).

1.1.3. Características anatomopatológicas

La localización menos frecuente fue el colon izquierdo (22.7%), con porcentajes similares en el colon derecho y el recto (39 y 38%, respectivamente). La mayoría de los tumores fueron diagnosticados en estadio II de la clasificación AJCC/TNM (49.5%), con escasa presencia de pacientes con tumores precoces (únicamente el 5% fueron diagnosticados en estadio I), con un 45% aproximadamente de pacientes diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad (estadios III y IV).

A nivel histopatológico, una de las principales características en este grupo de edad es la baja presencia de tumores con bajo grado de diferenciación (4%), evidenciándose moderado y alto grado de diferenciación en el 72.2 y 23.3% de los pacientes, respectivamente. No obstante, a pesar de la baja presencia de tumores pobremente diferenciados, es llamativa la elevada presencia de componente mucinoso (19.8%), con escasa aparición de células en anillo de sello (2.2%) (tabla IV.1).

Tabla IV.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, FAMILIARES Y ANATOMOPATOLÓGICAS GLOBALES DEL CCRAT

	<i>n (%)</i>
Pacientes	97 (100)
Edad media al diagnóstico (años, DE)	77.92 (5.73)
Sexo:	
Mujer	47 (48.5)
Varón	50 (51.5)
Localización tumoral:	
Colon derecho	38 (39.2)
Colon izquierdo	22 (22.7)
Recto	37 (38.1)
Supervivencia global (meses, DE) (IC 95%)	69.83 (11.23)
Supervivencia libre de enfermedad (meses, DE) (IC 95%)	21.68 (22.33)
Recidiva tumoral (%)	14.3

Mortalidad global a 5 años (%)	30.9
Pólipos asociados	62/97 (63.9)
Número de pólipos (DE)	2.7 (4.67)
Tipo de pólipos:	
Adenomatosos	38/62 (61.3)
Hiperplásicos	6/62 (9.7)
Mixtos	18/62 (29)
Neoplasias primarias múltiples	33/97 (34)
CCR sincrónico y/o metacrónico	21/97 (21.6)
Antecedentes familiares de cáncer:	
Ámsterdam II	1/97 (1)
Neoplasias relacionadas con SL	12/97 (12.4)
Neoplasias no relacionadas con SL	6/97 (6.2)
Esporádicos	78/97 (80.4)
Estadio tumoral (AJCC/TNM):	
I	5 (5.2)
II	48 (49.5)
III	25 (25.8)
IV	19 (19.6)
Grado de diferenciación:	
Alto	21/90 (23.3)
Moderado	65/90 (72.2)
Bajo	4/90 (4.4)
Componente mucinoso	18/91 (19.8)
Células en anillo de sello	2/91 (2.2)

n: número total de pacientes; DE: desviación estándar; IC: intervalo de confianza.

** El estudio del grado de diferenciación se realizó sobre 90 pacientes y el análisis del componente mucinoso y la presencia de células en anillo de sello sobre 91, debido al pequeño tamaño de la muestra de tumor en varios casos.*

1.1.4. Características moleculares

Las características moleculares globales de este grupo de pacientes se encuentran detalladas en la tabla IV.2.

En cuanto al análisis de la vía de la IMS, como se ha detallado previamente, fueron considerados dos grupos de pacientes: IMS-alta (o simplemente IMS) y EMS (incluyendo los casos con EMS e IMS-baja). Únicamente se objetivó IMS en el 9.3% de los pacientes, la mayoría asociados a mutaciones en *BRAF*^{V600E} o hipermetilación en su promotor (7.2%). De los 9 casos con IMS, se observó déficit de expresión de MLH1 y PMS2 en 5 casos, sólo déficit de expresión de MLH1 en 2 casos y en 2 casos déficit de expresión de MSH2 y MSH6. En este último caso se comprobó la presencia de mutación germinal en el gen *MSH2* por lo que fue diagnosticado de SL, en posible relación con una mutación *de novo*, ya que no cumplía criterios de Ámsterdam.

De los 90 casos estudiados para la vía del fenotipo metilador, la mayoría (48.9%) fueron CIMP-0. Como se preveía, los casos de CIMP-alto (24.4%) se encontraban en relación con los casos de IMS de tipo esporádico. Se unificaron los tumores CIMP-0 y CIMP-bajo en una única clasificación, CIMP-0/bajo. Se definieron cuatro categorías de tumores: IMS-CIMP-alto, EMS-CIMP-alto, IMS-CIMP-0/bajo y EMS-CIMP-0/bajo (Ogino S y Goel A, 2008). En el conjunto de pacientes ancianos predominaron los tumores con EMS-CIMP-0/bajo (73.3%).

El estudio de la IC mediante arrays de CGH se pudo realizar en 86 muestras debido a la presencia de material tumoral suficiente. En el conjunto de pacientes ancianos, el 35% no presentaron ningún cambio en cromosomas completos. Lo más llamativo de este análisis fue que la alteración en el número de copias (ANC) por caso fue menor del 50%, con un porcentaje de ganancias del 18.25% y un porcentaje de pérdidas del 21.52%, con una media de cromosomas alterados de 3.36 (tabla IV.2).

Las alteraciones recurrentes más frecuentes a nivel global fueron las pérdidas en 5q13 y 14q11 y las ganancias en 7q11, 7q21-q22, 19p13-p12, 19q13 y 20p11-q11, las cuales se encuentran reflejadas en tabla complementaria 1 y que serán detalladas más adelante, según su localización tumoral. En cuanto al IIG fue menor para ganancias y pérdidas, y mayor para normalidad (tabla IV.2).

Tabla IV.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES GLOBALES DEL CCRAT

	<i>n (%)</i>
IMS	9/97 (9.3)
Mutación en genes MMR	1/97 (1)
Mutación en <i>BRAF</i>	7/97 (7.2)
CIMP:	
CIMP-0	44/90 (48.9)
CIMP-bajo	24/90 (26.7)
CIMP-alto	22/90 (24.4)
Clasificación molecular según la IMS y el CIMP:	
IMS- CIMP-alto	7/90 (7.8)
IMS- CIMP-0/bajo	2/90 (2.2)
EMS- CIMP-alto	15/90 (16.7)
EMS- CIMP-0/bajo	66/90 (73.3)
IIG:	
Ganancias	0.147055
Pérdidas	0.200192
Normal	0.652745
ANC por caso:	
Total de ganancias	46.40
Total de pérdidas	18.25
Total de pérdidas	21.52
Media de cromosomas completos alterados	3.36

n: número total de pacientes; IMS: inestabilidad de microsatélites; EMS: estabilidad de microsatélites; genes MMR: genes reparadores de ADN; CIMP: fenotipo metilador de islotes de CpG; IIG: índice de inestabilidad genómica; ANC: alteración en el número de copias.

1.2. Análisis del CCRAT, según su localización tumoral

Los resultados del estudio comparativo del CCRAT según su localización tumoral se encuentran resumidos en las tablas IV.3 y IV.4.

De los 97 pacientes estudiados, como se ha descrito previamente, 38 (39.2%) presentaban cáncer de colon derecho, 22 (22.7%) cáncer de colon izquierdo y 37 (38.1%) cáncer de recto. La edad media al diagnóstico fue de 79 años en el caso de

tumores derechos, 74.8 años en tumores izquierdos y 78.5 años en tumores de recto, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,015$).

En cuanto a la distribución por sexo, existe una clara tendencia de tumores de colon derecho en mujeres (65.8%) frente al resto de localizaciones, siendo esta incidencia estadísticamente significativa ($p=0.023$) y claramente diferenciada respecto al grupo de varones, en el cual existió un predominio de tumores de colon izquierdo y recto (63.6 y 62.2%, respectivamente), respecto al colon derecho (34%) (tabla IV.3).

La SG en meses fue claramente menor en los pacientes con cáncer de recto y de colon derecho (31.6 y 45.9 meses de media, respectivamente), respecto a los tumores izquierdos (96.95 meses de media), siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el caso de los tumores rectales ($p=0.024$). La SLE en meses fue muy similar en los grupos de cáncer de colon derecho e izquierdo (31.68 meses de media en ambos) y claramente inferior en el grupo de cáncer de recto (16.25 meses de media), aunque no estadísticamente significativa. El porcentaje de pacientes con recidiva tumoral fue menor en el grupo de cáncer de recto, probablemente en relación con la menor SLE y SG, aunque no estadísticamente significativa, al igual que la mortalidad a 5 años, mayor en el grupo de cáncer de recto y cáncer de colon derecho, respecto a los tumores izquierdos (tabla IV.3).

Como se comentó previamente, es llamativa la presencia de pólipos en el CCRAT previos al diagnóstico o durante el seguimiento, siendo diagnosticados en el 64% de los pacientes, presentando una distribución similar entre las tres localizaciones. El número medio de pólipos asociados fue mayor en el colon izquierdo (5.41), respecto al colon derecho (1.78) y el recto (2), aunque no estadísticamente significativo. El mayor número de pólipos asociados fue de tipo adenomatoso, especialmente en la localización rectal (72%), siendo llamativa la ausencia de pólipos hiperplásicos en la localización izquierda, aunque con diferencias no significativas.

Los pacientes con neoplasias primarias múltiples presentaron menor tendencia en el grupo de localización rectal (24.3%), aunque no significativa, al igual que en el CCR sincrónico y/o metacrónico con una menor tendencia en el recto (11.1%) y mayor

en el colon izquierdo (36.4%), con diferencias tampoco significativas entre los tres grupos (tabla IV.3).

1.2.2. Características familiares

Aunque a nivel global la mayoría de los tumores fueron de tipo esporádico (80.4%), la menor proporción de casos esporádicos (55.5%) se observó en los tumores de colon izquierdo, frente a los tumores de recto con un 92%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.002$). El porcentaje de neoplasias relacionadas con SL fue mayor en tumores izquierdos (27.3%), sin evidencia de estas en la localización rectal. En cuanto a la presencia de neoplasias no relacionadas con SL, la localización más frecuente fue el colon izquierdo seguida del recto, aunque sin diferencias significativas (9.1 y 8.1%, respectivamente) (tabla IV.3).

1.2.3. Características anatomopatológicas

La mayoría de los pacientes presentaron estadios intermedios (II y III) de la enfermedad al diagnóstico, sin diferencias en el análisis por localizaciones respecto al estudio global, evidenciando el mayor porcentaje de tumores en estadio IV en la localización rectal (27.8%), con resultados similares en todas las localizaciones en cuanto a tumores poco avanzados (estadio I).

En relación con el grado de diferenciación tumoral, la mayoría de los pacientes presentaron tumores con moderado y alto grado de diferenciación, con el mayor porcentaje de tumores pobremente diferenciados en el colon derecho (8.6%), sin evidenciar ningún tumor pobremente diferenciado en la localización izquierda. Sí se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó por localizaciones el importante componente mucinoso de los tumores en este grupo de edad, siendo predominante en los tumores de colon derecho, con un 34.3% de tumores mucinosos frente al 9.1 y 11.8% de las localizaciones izquierda y rectal, respectivamente. No se observaron diferencias significativas respecto a la presencia de células en anillo de sello, evidenciándose su presencia únicamente en 2 casos de localización rectal (tabla IV.3).

Tabla IV. 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, FAMILIARES Y ANATOMOPATOLÓGICAS DEL CCRAT SEGÚN SU LOCALIZACIÓN TUMORAL

	Global <i>n</i> (%)	Colon derecho <i>n</i> (%)	Colon izquierdo <i>n</i> (%)	Recto <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X²)
Pacientes	97 (100)	38 (39.2)	22 (22.7)	37 (38.1)	
Edad media al diagnóstico (años, DE)	77.92 (5.73)	79.08 (6.01)	74.86 (4.96)	78.54 (5.36)	0.015
Sexo:					
Mujer	47 (48.5)	25 (65.8)	8 (36.4)	14 (37.8)	0.023
Varón	50 (51.5)	13 (34.2)	14 (63.6)	23 (62.2)	NS
Supervivencia global (meses, DE)	69.83 (11.23)	45.94 (4.50)	96.95 (10.26)	31.67 (3.87)	0.024
Supervivencia libre de enfermedad (meses, DE)	21.68 (22.33)	31.68 (34.91)	31.68 (34.91)	16.25 (14.48)	NS
Recidiva tumoral (%)	14.3	20	12.5	10	NS
Mortalidad global a 5 años (%)	30.9	33.3	19	36.4	NS
Pólipos asociados	62/97 (63.9)	24/38 (63.2)	13/22 (59.1)	25/37 (67.6)	NS
Número de pólipos (DE)	2.7 (4.67)	1.78 (2.17)	5.40 (7.67)	2.0 (3.52)	NS
Tipo de pólipos:					
Adenomatosos	38/62 (61.3)	13/24 (54.2)	7/13 (53.8)	18/25 (72)	NS
Hiperplásicos	6/62 (9.7)	3/24 (12.5)	0/13 (0)	3/25 (12)	
Mixtos	18/62 (29)	8/24 (33.3)	6/13 (46.2)	4/25 (16)	
Neoplasias primarias múltiples	33/97 (34)	15/38 (39.5)	9/22 (40.9)	9/37 (24.3)	NS
CCR sincrónico y/o metacrónico	21/97 (21.6)	9/38 (23.7)	8/22 (36.4)	4/37 (10.8)	NS
Antecedentes familiares de cáncer:					
Ámsterdam II	1/97 (1)	1/38 (2.7)	0/22 (0)	0/37 (0)	0.002
Neoplasias relacionadas con SL	12/97 (12.4)	6/38 (15.8)	6/22 (27.3)	0/37 (0)	
Neoplasias no relacionadas con SL	6/97 (6.2)	1/38 (2.7)	2/22 (9.1)	3/37 (8.1)	
Esporádicos	78/97 (80.4)	28/38 (73.7)	12/22 (55.5)	34/37 (91.9)	

IV. RESULTADOS

Estadio tumoral (AJCC/TNM):					
I	5 (5.2)	2 (5.3)	1 (4.5)	2 (5.6)	NS
II	48 (49.5)	22 (57.9)	8 (36.4)	18 (50)	
III	25 (25.8)	8 (21)	10 (45.5)	6 (16.7)	
IV	19 (19.6)	6 (15.8)	3 (13.6)	10 (27.8)	
Grado de diferenciación:					
Alto	21/90 (23.3)	10/35 (28.6)	5/22 (22.7)	6/33 (18.2)	NS
Moderado	65/90 (72.2)	22/35 (62.9)	17/22 (77.3)	26/33 (78.8)	
Bajo	4/90 (4.4)	3/35 (8.6)	0/22 (0)	1/33 (3)	
Componente mucinoso	18/91 (19.8)	12/35 (34.3)	2/22 (9.1)	4/34 (11.8)	0.022
Células en anillo de sello	2/91 (2.2)	0/35 (0)	0/22 (0)	2/34 (5.9)	NS

n: número total de pacientes; DE: desviación estándar; p: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (χ^2); NS: no significativo.

1.2.4. Características moleculares

Las características moleculares del CCRAT según la localización tumoral se encuentra resumidas en la tabla IV.4.

1.2.4.1. Vía de la inestabilidad de microsatélites y estado mutacional de *BRAF*

Como se ha comentado previamente, únicamente 9 casos presentaron IMS, siendo la mayoría de los pacientes de este grupo estables desde el punto de vista de los microsatélites (90.7%). El mayor porcentaje de los pacientes con IMS se objetivó en la localización derecha (18.4%), sin evidenciar ningún caso en la localización rectal, diferencias estadísticamente significativas ($p=0.023$). El caso no conocido previamente con diagnóstico de mutación germinal en el gen *MSH2* también se encontraba en el colon derecho, sin evidenciar alteración en genes MMR en el resto de las localizaciones. La pérdida de expresión en MLH1, ya fuera sola o en su unión a PMS2, se objetivó en 7 pacientes (7.2%). De los 9 pacientes con IMS, 7 de ellos se encontraron asociados a mutaciones en *BRAF*^{V600E} o hipermetilación en su promotor (7.2%). Como cabía esperar, la mayoría de los pacientes con mutación en *BRAF*^{V600E} se encontraron en el grupo de

tumores derechos, suponiendo un 13.2% de los pacientes de esta localización (tabla IV.4).

1.2.4.2. Fenotipo metilador

Los tumores de colon izquierdo destacaron por presentar menor estado de metilación respecto al resto de localizaciones (CIMP-0 en un 66.7% de los casos), aunque el CIMP-0 también resultó ser el estado predominante en los tumores derechos, aunque en menor medida (47.2%). La localización rectal fue aquella con mayor estado de metilación, siendo un 36.4% de los tumores de tipo CIMP-alto.

En cuanto a la clasificación molecular según la IMS y el CIMP, como se comentó previamente, en el conjunto de pacientes con CCRAT predominaron los tumores de tipo EMS-CIMP-0/bajo (73.3%). En la localización derecha, al igual que en el resto de las localizaciones, el predominio fue del tipo EMS-CIMP-0/bajo (75%), seguido por los tumores de tipo CIMP-alto e IMS (IMS- CIMP-alto) (13.9%). El 85.7% de los tumores izquierdos también fueron de tipo EMS-CIMP-0/bajo. En los tumores de recto, dada la ausencia de IMS, se distinguieron dos grupos predominantes: se evidenciaron dos grupos predominantes: los tumores con EMS y metilación baja (EMS-CIMP-0/bajo) (63,6%) y, en menor proporción, los tumores con EMS y metilación alta (EMS-CIMP-alto) (36,4%). Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p=0,002$) (tabla IV.4).

1.2.4.3. Vía de la inestabilidad cromosómica

Para este estudio fueron válidos 86 casos, de los cuales 35 se localizaron en el colon derecho, 19 en el colon izquierdo y 32 en el recto. La IC fue mayor en los tumores de colon derecho, no solo a expensas del IIG, sino también en cuanto a la ANC por caso. Por el contrario, la localización izquierda presentó un llamativo bajo índice de IC, siendo la localización rectal intermedia entre ambos, salvo en el número de cromosomas completos alterados en el que el recto fue la que presentó mayor número (3.76). Las diferencias entre las tres localizaciones no fueron estadísticamente significativas.

De los 35 casos localizados en el colon derecho, 10 no presentaron cambios en cromosomas enteros y 25 sí presentaron algún tipo de alteración (ganancias o pérdidas). La media de cromosomas completos alterados por caso fue de 3. La media de ANC por caso fue de 60, con una media de ganancias de 27 y una media de pérdidas de 33. La media de IIG para ganancias fue 0.183649, para pérdidas de 0.249820 y para normalidad de 0.566522 (tabla IV.4).

De los 19 casos localizados en el colon izquierdo, 13 no presentaron cambios en cromosomas enteros y sólo 6 pacientes presentaron algún tipo de alteración. La media de cromosomas completos alterados por caso fue de 1. La media de ANC por caso fue de 17, con una media de ganancias de 5 y una media de pérdidas de 8. En cuanto al IIG, la media para ganancias fue de 0.101056, la media para pérdidas fue de 0.114539 y la media para normalidad de 0.784362.

Por último, de los 32 casos localizados en el recto, 7 no presentaron cambios en cromosomas enteros, evidenciando en 25 casos algún tipo de alteración. La media de cromosomas completos alterados por caso fue de 3.76, mayor que en la localización derecha, con una media de ANC por caso de 49 (17.5 para ganancias y 17 para pérdidas). En el análisis del IIG, la media para ganancias fue de 0.133332, la media para pérdidas de 0.194276 y la media para normalidad de 0.672383 (tabla IV.4).

Tabla IV.4. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL CCRAT SEGÚN SU LOCALIZACIÓN TUMORAL

	Global <i>n</i> (%)	Colon derecho <i>n</i> (%)	Colon izquierdo <i>n</i> (%)	Recto <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X²)
IMS	9/97 (9.3)	7/38 (18.4)	2/22 (9.1)	0/37 (0)	0.023
Mutación en genes MMR	1/97 (1)	1/38 (2.6)	0/22 (0)	0/37 (0)	NS
Mutación en <i>BRAF</i>	7/97 (7.2)	5/38 (13.2)	1/22 (4.5)	1/37 (2.7)	NS
CIMP:					
CIMP-0	44/90 (48.9)	17/36 (47.2)	14/21 (66.7)	13/33 (39.4)	NS
CIMP-bajo	24/90 (26.7)	12/36 (33.3)	4/21 (19)	8/33 (24.2)	
CIMP-alto	22/90 (24.4)	7/36 (19.4)	3/21 (14.3)	12/33 (36.4)	

IV. RESULTADOS

Clasificación molecular según la IMS y el CIMP:					
IMS- CIMP-alto	7/90 (7.8)	5/36 (13.9)	2/21 (9.5)	0/33 (0)	0.002
IMS- CIMP-0/bajo	2/90 (2.2)	2/36 (5.6)	0/21 (0)	0/33 (0)	
EMS- CIMP-alto	15/90 (16.7)	2/36 (5.6)	1/21 (4.8)	12/33 (36.4)	
EMS- CIMP-0/bajo	66/90 (73.3)	27/36 (75)	18/21 (85.7)	21/33 (63.6)	
IIG:					
Ganancias	0.147055	0.183649	0.101056	0.133332	NS
Pérdidas	0.200192	0.249820	0.114539	0.194276	
Normal	0.652745	0.566522	0.784362	0.672383	
ANC por caso:	46.40	60	17	49	NS
Total de ganancias	18.25	27	5	17.5	
Total de pérdidas	21.52	33	8	17	
Media de cromosomas completos alterados	3.36	3	1.39	3.76	NS

n: número total de pacientes; p: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (χ^2); NS: no significativo; IMS: inestabilidad de microsatélites; EMS: estabilidad de microsatélites; genes MMR: genes reparadores de ADN; CIMP: fenotipo metilador de islotes de CpG; IIG: índice de inestabilidad genómica; ANC: alteración en el número de copias.

** Para este estudio fueron válidos 86 casos, de los cuales 35 se localizaron en el colon derecho, 19 en el colon izquierdo y 32 en el recto.*

Las regiones recurrentemente alteradas (ya sean ganancias o pérdidas) en las diferentes localizaciones se encuentran reflejadas en la tabla complementaria 1. Las regiones recurrentemente alteradas, ya fueran ganancias o pérdidas, fueron algo mayores en la localización derecha, seguida por la localización rectal.

Individualmente, las regiones recurrentemente alteradas más frecuentes en la localización derecha fueron las ganancias en 7q11.21 y 7q11.23, y las pérdidas en 18q22.1-22.3; en la localización izquierda, las pérdidas en 10q11.21-11.23; y en la localización rectal, las ganancias en 7q11.22-11.23. Las únicas regiones recurrentes observadas en las tres localizaciones fueron las ganancias en 7q11.22-11.23 y en 20q11.1-q11.23. Existen cuatro regiones recurrentes comunes a la localización derecha e izquierda: las pérdidas en 18q12.1-12.2, 18q21.1 y 18q22.1-23; y las ganancias en 7p22.1. Únicamente se apreciaron dos regiones recurrentemente alteradas comunes a la localización izquierda y rectal, que fueron las pérdidas en 5p15.33-15.31 y las

alteraciones en 1q21.1-21.2. Por último, hay que destacar la elevada proporción de regiones recurrentemente alteradas comunes a la localización derecha y rectal.

2. Resumen de resultados en pacientes con CCR jóvenes

Los resultados del análisis del grupo de pacientes con CCRJ se encuentran descritos y publicados en la tesis doctoral “Características diferenciales de las principales vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal de aparición precoz según su localización” (Fernández-Miguel T, 2021) y en el artículo titulado “*Classifying early-onset colorectal cancer according to tumor location: new potential subcategories to explore*” (Perea J *et al.*, 2015), por lo que se describe un resumen de dichos resultados que, posteriormente, se ampliará en el análisis comparativo con el grupo de CCRAT.

En la tabla IV.5 se resumen las características clínicas, familiares y anatomopatológicas y en la tabla IV.6 las características moleculares según su localización tumoral, del grupo de pacientes con CCRJ.

Tabla IV. 5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, FAMILIARES Y ANATOMOPATOLÓGICAS GLOBALES DEL CCRJ SEGÚN SU LOCALIZACIÓN TUMORAL

	Global n (%)	Colon derecho n (%)	Colon izquierdo n (%)	Recto n (%)	p (X²)
Pacientes	82 (100)	20 (24)	35 (43)	27 (33)	
Edad media al diagnóstico (años, DE)	39.6 (4.9)	39.1 (6)	39.3 (4.2)	40.2 (4.9)	NS
Sexo:					
Mujer	33 (40.2)	10 (50)	13 (37)	10 (37)	NS
Varón	49 (59.8)	10 (50)	22 (63)	17 (63)	
Supervivencia global (meses, DE) (IC 95%)	140.90 (9)	180.03 (11.28)	76.67 (6.82)	64.79 (8.32)	<0.001
Supervivencia libre de enfermedad (meses, DE) (IC 95%)	50.8 (39.9)	72.4 (42.6)	48.7 (37.2)	36.7 (35.2)	0.006
Recidiva tumoral n (%)	10 (12.19)	4 (21.1)	3 (11.5)	3 (17.6)	
Mortalidad global n (%)	25 (30.48)	2 (10)	10 (28.6)	13 (48.1)	

IV. RESULTADOS

Pólipos asociados	46 (56)	14 (70)	21 (60)	11 (41)	NS
Número de pólipos (DE)	1.8 (2.5)	3 (3.2)	1.6 (1.9)	1.2 (2.3)	0.046
Tipo de pólipos:					
Adenomatosos	22 (48)	5 (36)	10 (48)	7 (64)	
Hiperplásicos	8 (17)	2 (14)	4 (19)	2 (18)	
Mixtos	16 (35)	7 (50)	7 (33)	2 (18)	NS
Neoplasias primarias múltiples	11 (13)	5 (25)	4 (11)	2 (7)	NS
CCR sincrónico y/o metacrónico	5 (6)	4 (20)	0 (0)	1 (4)	0.01
Antecedentes familiares de cáncer:					
Ámsterdam II	15 (18)	8 (40)	6 (17.1)	1 (3.7)	
Neoplasias relacionadas con SL	27 (33)	7 (35)	6 (17)	14 (51.8)	0.006
Neoplasias no relacionadas con SL	9 (11)	1 (5)	6 (17)	2 (7.4)	
Esporádicos	31 (38)	4 (20)	17 (48)	10 (37)	
Estadio tumoral (AJCC/TNM):					
I	23 (28)	4 (20)	12 (34)	7 (26)	
II	26 (32)	12 (60)	12 (34)	2 (7)	
III	14 (17)	3 (15)	3 (9)	8 (30)	0.002
IV	19 (23)	1 (5)	8 (23)	10 (37)	
Grado de diferenciación:					
Alto	20/60 (33.3)	5/16 (31.3)	9/24 (37.5)	6/20 (30)	
Moderado	32/60 (53.3)	7/16 (43.8)	12/24 (50)	13/20 (65)	NS
Bajo	8/60 (13.3)	4/16 (25)	3/24 (12.5)	1/20 (5)	
Componente mucinoso	19/60 (32)	6/16 (37.5)	8/24 (33)	5/20 (10)	NS
Células en anillo de sello	4/60 (7)	0/16 (0)	2/24 (8)	2/20 (10)	NS

n: número total de pacientes; DE: desviación estándar; IC: intervalo de confianza; p: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (χ^2); NS: no significativo.

**Si bien la muestra inicial fue de 82 pacientes, no se pudieron realizar estudios anatomopatológicos y/o moleculares en algunos de los casos, bien porque sólo se disponía de material de la biopsia tumoral, generalmente en las presentaciones en estadio IV o los pacientes con carcinoma in situ extirpado endoscópicamente, o porque tras la realización de las distintas técnicas no quedaba disponible más material tumoral. Por ello, los porcentajes de las distintas características varían sobre el total de los pacientes estudiados.*

Tabla IV. 6. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES GLOBALES DEL CCRJ SEGÚN SU LOCALIZACIÓN TUMORAL

	Global <i>n (%)</i>	Colon derecho <i>n (%)</i>	Colon izquierdo <i>n (%)</i>	Recto <i>n (%)</i>	<i>p</i> (χ^2)
IMS	12/81 (14.8)	6/20 (30)	6/35 (17)	0/26 (0)	0.016

IV. RESULTADOS

Mutación en genes MMR	10/82 (12.2)	6 (30)	4 (11)	0 (0)	0.009
Mutación en <i>BRAF</i>	7/71 (1.4)	0/18 (0)	1/31 (3.2)	0/22 (0)	NS
CIMP:					
CIMP-0	24 (37.5)	2 (12.5)	14 (45)	11 (52)	0.005
CIMP-bajo	27 (42.2)	6 (37.5)	14 (45)	8 (38)	
CIMP-alto	13 (20.3)	8 (50)	3 (10)	2 (10)	
Clasificación molecular según la IMS y el CIMP:					
IMS- CIMP-alto	4 (6.2)	3 (19)	1 (3)	0 (0)	0.007
IMS- CIMP-0/bajo	6 (9.4)	2 (12.5)	4 (13)	0 (0)	
EMS- CIMP-alto	9 (14)	5 (31)	2 (6.5)	2 (9.5)	
EMS- CIMP-0/bajo	45 (70.3)	6 (37.5)	24 (77.5)	19 (90.5)	
IIG:					
Ganancias	0.109907	0.113710	0.1462817	0.1627359	NS
Pérdidas	0.199890	0.023009	0.2294307	0.1441914	0.009
Normal	0.654232	0.796933	0.784362	0.6930648	0.05
ANC por caso:					
Total de ganancias	76	90	101	36	
Total de pérdidas	30	40	21	21.5	
	45	49	80	14.5	
Media de cromosomas completos alterados	2	1	6	3	

n: número total de pacientes; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (X^2); NS: no significativo; IMS: inestabilidad de microsatélites; EMS: estabilidad de microsatélites; genes MMR: genes reparadores de ADN; CIMP: fenotipo metilador de islotes de CpG; IIG: índice de inestabilidad genómica; ANC: alteración en el número de copias.

**Si bien la muestra inicial fue de 82 pacientes, no se pudieron realizar estudios anatomopatológicos y/o moleculares en algunos de los casos, bien porque sólo se disponía de material de la biopsia tumoral, generalmente en las presentaciones en estadio IV o los pacientes con carcinoma in situ extirpado endoscópicamente, o porque tras la realización de las distintas técnicas no quedaba disponible más material tumoral. Por ello, los porcentajes de las distintas características varían sobre el total de los pacientes estudiados.*

Las regiones recurrentemente alteradas (ya sean ganancias o pérdidas) en las diferentes localizaciones se encuentran reflejadas en la tabla complementaria 2.

3. Análisis comparativo de los resultados en CCR de aparición tardía y jóvenes, según su localización en el colon

Los resultados del análisis comparativo del CCRAT y el CCRJ han sido parcialmente publicados en el artículo “Clinical and molecular comparative study of colorectal cancer based on age-of-onset and tumor location: two main criteria for subclassifying colorectal cancer” (Álvaro E *et al.*, 2019) (Anexo 4).

3.1. Características clínicas y de seguimiento

En el análisis comparativo de la localización tumoral en los distintos grupos de edad, se observa predominio de tumores en el colon izquierdo en el grupo de pacientes jóvenes (42.7%), frente a tumores en el colon derecho (39.2%) y el recto (38.1%) en el grupo de CCRAT, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.009$) (tabla IV.7). En cuanto a la distribución por sexo, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas según la localización tumoral, si bien sí se observó la predominancia global del sexo femenino en los tumores de colon derecho en ambos grupos de edad, más predominante en el grupo de CCRAT (66% de los tumores de colon derecho eran mujeres), con predominio masculino en los tumores de colon izquierdo y recto, muy similar en ambos grupos de edad, como se puede observar en la tabla IV.7.

Tabla IV. 7. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA DISTRIBUCIÓN POR SEXO DEL CCRJ Y DEL CCRAT SEGÚN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL

	CCRJ		CCRAT		<i>p</i> (X ²)
	Mujer	Varón	Mujer	Varón	
Colon derecho <i>n</i> (%)	10 (50)	10 (50)	25 (65.8)	13 (34.2)	0.243
Colon izquierdo <i>n</i> (%)	13 (31.7)	22 (62.9)	8 (36.4)	14 (63.6)	0.953
Recto <i>n</i> (%)	10 (37)	17 (63)	14 (37.8)	23 (62.2)	0.948

n: número total de pacientes; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (X²).

Respecto al análisis de la SLE en ambos grupos de edad, fue claramente mayor en el grupo de pacientes jóvenes, con independencia de su localización tumoral, siendo llamativamente superior ($p<0.001$) en los tumores de colon derecho y recto respecto al grupo de CCRAT (72.4 y 36.7 meses en el grupo de CCRJ, frente a 31.68 y 16.25 meses en el grupo de CCRAT).

En cuanto al análisis de la SG, como se comentó previamente, se observaron diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo de pacientes con CCRAT, siendo la SG claramente menor en los pacientes con cáncer de recto y de colon derecho (31.6 y 45.94 meses, respectivamente), en contraste con el análisis del grupo de pacientes jóvenes, en el que la SG fue claramente superior en la localización derecha (180.03 meses) respecto al resto de localizaciones, con resultado también significativo ($p<0.001$). En el análisis comparativo por cada una de las localizaciones tumorales, sí se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, con predominio en el grupo de CCRJ de tumores de colon derecho y recto ($p<0.001$), siendo especialmente llamativa la diferencia de la SG en la localización derecha (180.03 meses en el grupo de CCRJ frente a 45.9 meses en el grupo de CCRAT). La única localización donde la SG fue mayor en el grupo de CCRAT fue en el colon izquierdo, aunque sin resultado significativo (tabla IV.8).

El análisis de la tasa de recidiva tumoral tras tratamiento con intención curativa en ambos grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas ni en conjunto ni en las diferentes localizaciones, únicamente resaltar el mayor porcentaje de recidiva tumoral en ambos grupos en la localización derecha, con cifras similares entorno al 20% durante el seguimiento.

La mortalidad global, relacionada y no relacionada con cáncer, fue mayor en la localización rectal para ambos grupos de edad (48.1% en el grupo del CCRJ y 36.4% en el grupo de CCRAT), aunque sin diferencias estadísticamente significativas, cifras proporcionales al porcentaje de pacientes diagnosticados en estadio IV en ambos grupos de edad (37% en el grupo de CCRJ y 28% en el grupo de CCRAT). Igualmente, se objetivó una mayor mortalidad en la localización derecha en el grupo de CCRAT respecto a los jóvenes (33.3%). En cuanto a la mortalidad relacionada con CCR, en el 100% de los pacientes del grupo de CCRJ la causa del fallecimiento fue el CCR, frente al 75% de los pacientes del grupo de CCRAT, cifras que pueden explicar en parte la mayor mortalidad global en el grupo de CCRAT aun con cifras de estadio IV al diagnóstico menores en este grupo de edad (tabla IV.8).

Las diferencias en ambos grupos de edad respecto a la SLE, SG, recidiva tumoral en el seguimiento y mortalidad global se muestran en la tabla IV.8.

Tabla IV. 8. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD, LA SUPERVIVENCIA GLOBAL, LA RECIDIVA TUMORAL Y LA MORTALIDAD GLOBAL EN EL CCRJ Y EN EL CCRAT SEGÚN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL

		Colon derecho <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)	Colon izquierdo <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)	Recto <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)
CCRJ	Supervivencia libre de enfermedad (meses, DE) (IC 95%)	72.4 (42.6)		48.7 (37.2)		36.7 (35.2)	
	Supervivencia global (meses, DE) (IC 95%)	180.03 (11.28)		76.67 (6.82)		64.79 (8.32)	
	Recidiva tumoral <i>n</i> (%)	4 (21.1)		3 (11.5)		3 (17.6)	
	Mortalidad global <i>n</i> (%)	2 (10)		10 (28.6)		13 (48.1)	
CCRAT	Supervivencia libre de enfermedad (meses, DE) (IC 95%)	31.68 (34.91)	0.002	31.68 (34.91)	0.179	16.25 (14.48)	<0.001
	Supervivencia global (meses, DE) (IC 95%)	45.94 (4.50)	0.003	96.95 (10.26)	0.319	31.67 (3.87)	<0.001
	Recidiva tumoral <i>n</i> (%)	4 (20)	0.935	2 (12.5)	0.926	2 (10)	0.498
	Mortalidad global <i>n</i> (%)	9 (33.3)	0.062	4 (19)	0.426	12 (36.4)	0.357

n: número total de pacientes; DE: desviación estándar; IC: intervalo de confianza; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (X²).

El número de pólipos asociados ya fuera en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento fue globalmente mayor en el grupo de CCRAT (63.9% frente a 56%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa en la localización rectal (41% en el grupo del CCRJ frente al 67.6% en el grupo de CCRAT, *p*=0.040). La única localización donde se objetivó mayor número de pólipos en el grupo de pacientes jóvenes fue el colon derecho (70% de los pacientes), aunque con diferencias no

estadísticamente significativas. En su distribución por localizaciones, sí fue significativa la diferencia en el número medio de pólipos en el colon izquierdo, siendo de 5.4 pólipos en el grupo de CCRAT frente a 1.6 pólipos en el grupo de CCRJ ($p<0.001$). En ambos grupos el tipo de pólipos predominantes fueron los adenomatosos (61.3% en el grupo de CCRAT y 48% en el grupo de CCRJ), especialmente en la localización rectal, con diferencias no estadísticamente significativas en ninguna localización, siendo el tipo de pólipos menos frecuente en ambos grupos el hiperplásico.

En el grupo de CCRAT un 34% de los pacientes fueron diagnosticados de neoplasias primarias múltiples, diferentes de CCR, frente al 13% en el grupo de CCRJ, siendo especialmente relevantes la presencia de neoplasias primarias múltiples en el colon derecho e izquierdo (39.5% y 40.9%, respectivamente) en el grupo de CCRAT frente al grupo de jóvenes (25% y 11%, respectivamente).

La presencia de CCR sincrónico y/o metacrónico se evidenció en un 21.6% de los pacientes del grupo de CCRAT frente al 6% del grupo de CCRJ. Esta diferencia fue significativamente mayor ($p<0.001$) en la localización izquierda (36.4% en el grupo de CCRAT frente a 0 pacientes en el grupo de CCRJ). El colon derecho en ambos grupos fue la localización más frecuente de diagnóstico de CCR sincrónico (20% en el grupo de CCRJ y 24.3% en el grupo de CCRAT), siendo significativa esta diferencia respecto al resto de localizaciones únicamente en el grupo de pacientes jóvenes ($p<0.01$).

3.2. Características familiares

Como era de esperar, el cumplimiento de los criterios de Ámsterdam II para el diagnóstico de SL fue mayor en las familias de los pacientes del grupo de CCRJ (18%) frente al CCRAT (1%), diferencias especialmente relevantes en la localización derecha, donde el 40% de los pacientes con tumores de colon derecho pertenecían a familias que cumplían criterios de Ámsterdam II ($p<0.001$) (tabla IV.9).

Igualmente, los antecedentes familiares de neoplasias relacionadas con SL fueron superiores en el grupo de CCRJ (33%) frente al 12.4% en el grupo de CCRAT, con diferencias significativas en todas las localizaciones entre ambos grupos y especialmente relevantes en la localización derecha y rectal (35% y 51.8%, respectivamente, en el grupo de CCRJ y 15.8% y 0%, respectivamente, en el grupo de

CCRAT). La única localización en la que predominaron las neoplasias relacionadas con SL en el grupo de CCRAT fue el colon izquierdo con una menor diferencia respecto al resto de localizaciones, aunque también estadísticamente significativa ($p=0.049$).

Entre los antecedentes familiares de neoplasias no relacionadas con SL cabe descartar la menor agregación familiar global en el grupo de CCRAT frente al CCRJ, aunque con cifras muy similares entre ambos grupos de edad. La mayor diferencia se evidenció en la localización izquierda (17% en el grupo de CCRJ frente al 9.1% en el grupo de CCRAT) (tabla IV.9).

Por último, la mayoría de los tumores diagnosticados en el grupo de CCRAT (80.4%) fueron de tipo esporádico, frente al 38% en el grupo de CCRJ, grupo con mayor agregación familiar global, con diferencias especialmente significativas en el colon derecho y el recto (73.7% y 91.9%, respectivamente, en el grupo de CCRAT y 20% y 37%, respectivamente, en el grupo de CCRJ). El análisis comparativo de los antecedentes familiares según la localización tumoral entre ambos grupos de edad se encuentra resumido en la tabla IV.9.

Tabla IV. 9. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS ANTECEDENTES FAMILIARES EN EL CCRJ Y EN EL CCRAT SEGÚN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL

		Colon derecho <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)	Colon izquierdo <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)	Recto <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)
CCRJ	Antecedentes familiares de cáncer:						
	Ámsterdam II	8 (40)		6 (17.1)		1 (3.7)	
	Neoplasias relacionadas con SL	7 (35)		6 (17)		14 (51.8)	
	Neoplasias no relacionadas con SL	1 (5)		6 (17)		2 (7.4)	
	Casos esporádicos	4 (20)		17 (48)		10 (37)	
CCRAT	Antecedentes familiares de cáncer:						
	Ámsterdam II	1 (2.7)	<0.001	0 (0)	0.115	0 (0)	NS
	Neoplasias relacionadas con SL	6 (15.8)	0.008	6 (27.3)	0.049	0 (0)	<0.001
	Neoplasias no relacionadas con SL	1 (2.7)	0.456	2 (9.1)	0.349	3 (8.1)	0.535
	Casos esporádicos	28 (73.7)	<0.001	12 (55.5)	0.883	34 (91.9)	<0.001

n: número total de pacientes; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (X²).

3.3. Características anatomopatológicas

Entre las características anatomopatológicas, cabe destacar la estadificación tumoral de los pacientes al diagnóstico. Como se ha comentado previamente, en el grupo de pacientes con CCRAT la mayoría de los tumores fueron diagnosticados en estadio II de la clasificación AJCC/TNM (49.5%), con escasa presencia de pacientes con tumores precoces (el 5% fueron diagnosticados en estadio I), a pesar de la existencia de los programas de *screening* en este grupo de edad. En el grupo de CCRJ, las diferencias no fueron tan llamativas entre los distintos estadios tumorales, si bien la mayoría de los pacientes también fueron diagnosticados en estadio II (32%), con un mayor número de pacientes diagnosticados en estadio I (28%) respecto al grupo de CCRAT. Los pacientes con peor pronóstico (aquellos diagnosticados en estadio IV) fueron muy similares en ambos grupos de edad, aunque algo mayores en el grupo de pacientes jóvenes (23%) (tabla IV.10).

En cuanto a las diferencias en la estadificación tumoral entre ambos grupos según la localización tumoral, las principales diferencias se objetivaron en la localización izquierda y el recto y se encuentran resumidas en la tabla IV.10. En el colon izquierdo, la principal diferencia se objetivó en el estadio I, con un 34% de los pacientes diagnosticados en estadio precoz en el grupo de CCRJ frente a únicamente el 4.5% en el grupo de CCRAT. El 45.5% de los pacientes del grupo de CCRAT fueron diagnosticados en estadio III (frente al 9% de los pacientes del grupo de CCRJ), siendo menor en este grupo (13.6%) los pacientes en estadio IV respecto al grupo de jóvenes (23%). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0.003$). En el recto también existen diferencias en estadios precoces similares al colon izquierdo, con un 26% de pacientes diagnosticados en el grupo de CCRJ frente a un 5.6% en el grupo de CCRAT. La principal diferencia se objetivó en el estadio II, con un 50% de los pacientes en el grupo de CCRAT frente a un 7% de los pacientes en el grupo de jóvenes. El porcentaje de pacientes en estadio IV también fue mayor, al igual que en el colon izquierdo, en el grupo de pacientes jóvenes (37% y 16.7%, respectivamente). Estas diferencias también fueron estadísticamente significativas ($p=0.002$) (tabla IV.10).

Tabla IV. 10. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTADIFICACIÓN TUMORAL DE LA CLASIFICACIÓN AJCC/TNM EN EL CCRJ Y EN EL CCRAT SEGÚN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL

		Colon derecho	p (X^2)	Colon izquierdo	p (X^2)	Recto n (%)	p (X^2)
		n (%)		n (%)			
CCRJ	Estadio tumoral (AJCC/TNM):						
	I	4 (20)		12 (34)		7 (26)	
	II	12 (60)		12 (34)		2 (7)	
	III	3 (15)		3 (9)		8 (30)	
	IV	1 (5)		8 (23)		10 (37)	
CCRAT	Estadio tumoral (AJCC/TNM):						
	I	2 (5.3)		1 (4.5)		2 (5.6)	
	II	22 (57.9)		8 (36.4)		18 (50)	
	III	8 (21)		10 (45.5)		6 (16.7)	
	IV	6 (15.8)	0.232	3 (13.6)	0.003	10 (27.8)	0.002

n: número total de pacientes; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (X^2).

Desde el punto de vista histopatológico, una de las principales características en el grupo de CCRAT es la baja presencia de tumores con bajo grado de diferenciación (4.4%), siendo predominantes los tumores con moderado grado de diferenciación (72.2% de los pacientes). En el grupo de CCRJ existe mayor número de pacientes con tumores con bajo grado de diferenciación a nivel global (13.3%), si bien el mayor porcentaje también corresponde, al igual que en el grupo de CCRAT, a los tumores con moderada diferenciación (53.3%). En el análisis por localizaciones, destacan mayores diferencias en los tumores con bajo grado de diferenciación fundamentalmente en la localización derecha (25% en el grupo de CCRJ y 8.6% en el grupo de CCRAT) y la localización izquierda (12.5% en el grupo de CCRJ y 0% en el grupo de CCRAT), aunque no fueron estadísticamente significativas.

Como se comentó previamente, a pesar de la baja presencia de tumores pobremente diferenciados en el grupo de CCRAT, llama la atención en este grupo de edad la elevada presencia de componente mucinoso (19.8%), con escasa aparición de células en anillo de sello (2.2%), aunque el mayor componente mucinoso a nivel global (32% de los pacientes) se evidencia en el grupo de jóvenes. En cuanto a las

localizaciones, destaca el elevado componente mucinoso en la localización derecha en ambos grupos de edad respecto al resto de localizaciones (37.5% en el grupo de CCRJ y 34.3% en el grupo de CCRAT), con escasa presencia de células en anillo de sello, las cuales fueron predominantes, en ambos grupos, en la localización rectal. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna localización.

3.4. Características moleculares

3.4.1. Vía de la inestabilidad de microsatélites y estado mutacional de *BRAF*

En el grupo de pacientes con CCRAT únicamente se evidenció IMS en el 9.3%, siendo la mayoría de los pacientes estables desde el punto de vista de los microsatélites. En el grupo de pacientes jóvenes también predominaron a nivel global los pacientes estables, pero con mayor porcentaje respecto al grupo de CCRAT de pacientes con IMS (14.8%). La localización con mayor porcentaje de IMS en ambos grupos fue la localización derecha (30% en el CCRJ y 18.4% en el CCRAT). Por último, destaca la ausencia de IMS en ambos grupos en la localización rectal (tabla IV.11).

En el grupo de CCRAT fue diagnosticado un caso no conocido previamente de mutación germinal en el gen *MSH2*, con perfil familiar de tipo esporádico, localizado en el colon derecho. El mayor número de pacientes diagnosticados de SL fue en el grupo de pacientes con CCRJ (6 pacientes con localización derecha y 4 pacientes con localización izquierda), siendo la localización derecha estadísticamente significativa para SL ($p=0.002$). Todos los casos de presencia de IMS en colon derecho presentaron mutación en genes MMR y diagnóstico de SL, mientras que en la localización izquierda de los 6 casos confirmados con IMS únicamente 4 presentaron mutación en genes MMR y diagnóstico de SL. Se evidenció un caso de hipermetilación del promotor de *MLH1* y un caso con ausencia de expresión proteica de *MSH6*, pero sin mutación en *MSH6* (síndrome de *Lynch-like*). En cuanto a la agregación familiar en este grupo de pacientes, se evidenciaron mutaciones germinales en cuatro casos en el gen *MLH1*, en cuatro casos en el gen *MSH2* y en dos casos en el gen *MSH6*. En ocho de los casos se cumplían criterios de Ámsterdam II para SL y en dos casos se evidenciaron antecedentes familiares de tumores relacionados con SL, aunque sin llegar a cumplir criterios.

Respecto al estado mutacional de $BRAF^{V600E}$, únicamente un paciente en el grupo de jóvenes presentó mutación en el gen y fue localizado en el colon izquierdo. En el grupo de pacientes con CCRAT, de los 9 pacientes con IMS, 7 de ellos se encontraron asociados a mutaciones en $BRAF^{V600E}$ o hipermetilación en su promotor (7.2%). Como cabía esperar, la mayoría de los pacientes con mutación en $BRAF^{V600E}$ se encontraron en el grupo de tumores derechos (13.2% de los pacientes), no resultando estadísticamente significativo respecto al grupo de CCRJ (tabla IV.11).

El análisis comparativo de la IMS, la mutación en genes MMR y el estado mutacional de $BRAF$ según la localización tumoral en ambos grupos de pacientes se encuentra resumido en la tabla IV.11.

Tabla IV. 11. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA IMS, LA MUTACIÓN EN GENES MMR Y EL ESTADO MUTACIONAL DE $BRAF$ EN EL CCRJ Y EN EL CCRAT SEGÚN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL

		Colon derecho <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X^2)	Colon izquierdo <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X^2)	Recto <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X^2)
CCRJ	IMS	6 (30)		6 (17)		0 (0)	
	Mutación en genes MMR	6 (30)		4 (11)		0 (0)	
	Mutación en $BRAF$	0 (0)		1 (3.2)		0 (0)	
CCRAT	IMS	7 (18.4)	0.315	2 (9.1)	0.394	0 (0)	-
	Mutación en genes MMR	1 (2.6)	0.002	0 (0)	0.100	0 (0)	-
	Mutación en $BRAF$	5 (13.2)	0.107	1 (4.5)	0.804	1 (2.7)	0.437

n: número total de pacientes; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (X^2); IMS: inestabilidad de microsatélites; genes MMR: genes reparadores de ADN.

3.4.2. Fenotipo metilador

El estado de metilación a nivel global fue muy similar entre ambos grupos de edad, con un porcentaje de CIMP-0 algo mayor en el grupo de pacientes de CCRAT

(48.9% y 37.5%, respectivamente), aunque no estadísticamente significativo. En el análisis por localizaciones, llama la atención la mayor proporción de fenotipo metilador (CIMP-alto) en el colon derecho en el grupo de pacientes jóvenes respecto al grupo de CCRAT (50% y 19.4%, respectivamente), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.019$). En el colon izquierdo y el recto, el estado de metilación es algo mayor en el grupo de pacientes de CCRAT, especialmente en la localización rectal, aunque con diferencias no significativas (tabla IV.12).

Respecto a la clasificación molecular según la IMS y el CIMP (Ogino S y Goel A, 2008), en ambos grupos predominaron a nivel global los tumores de tipo EMS-CIMP-0/bajo (73.3% en el grupo de CCRAT y 70.3% en el grupo de CCRJ). Los tumores menos frecuentes en el grupo de CCRJ fueron los de tipo IMS-CIMP-alto (6.2%), siendo menos frecuentes en el grupo de CCRAT los tumores de tipo IMS-CIMP-0/bajo (2.2%).

Respecto a la clasificación de los tumores por localización tumoral, cabe destacar en el colon derecho un mayor predominio de tumores de tipo EMS-CIMP-0/bajo en el grupo de CCRAT respecto a los pacientes jóvenes (75% y 37.5%, respectivamente), con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.019$). También es llamativa la mayor proporción de tumores de tipo EMS-CIMP-alto en el grupo de pacientes jóvenes respecto al grupo de CCRAT (31% y 5.6%, respectivamente). En el colon izquierdo, fueron claramente predominantes en ambos grupos de edad los tumores con EMS y bajo perfil de metilación (77.5% en el grupo de CCRJ y 85.7% en el grupo de CCRAT), con ausencia de IMS en el grupo de CCRAT, aunque con diferencias no estadísticamente significativas en el análisis comparativo. En el recto, destaca la ausencia de IMS en ambos grupos de edad como ya se comentó previamente, con un claro predominio de los tumores de tipo EMS-CIMP-0/bajo en el grupo de CCRJ frente al grupo de CCRAT (90.5% y 63.6%, respectivamente), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.035$) (tabla IV.12).

El análisis comparativo del fenotipo metilador y la clasificación molecular según la IMS y el CIMP en ambos grupos de edad según la localización tumoral se encuentra reflejado en la tabla IV.12.

Tabla IV. 12. ANALISIS COMPARATIVO DEL FENOTIPO METILADOR Y LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR SEGÚN LA IMS Y EL CIMP EN EL CCRJ Y EN EL CCRAT SEGÚN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL

		Colon derecho <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)	Colon izquierdo <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)	Recto <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)
CCRJ	CIMP:						
	CIMP-0	2 (12.5)		14 (45)		11 (52)	
	CIMP-bajo	6 (37.5)		14 (45)		8 (38)	
	CIMP-alto	8 (50)		3 (10)		2 (10)	
	Clasificación molecular según la IMS y el CIMP:						
	IMS- CIMP-alto	3 (19)		1 (3)		0 (0)	
	IMS- CIMP-0/bajo	2 (12.5)		4 (13)		0 (0)	
	EMS- CIMP-alto	5 (31)		2 (6.5)		2 (9.5)	
	EMS- CIMP-0/bajo	6 (37.5)		24 (77.5)		19 (90.5)	
CCRAT	CIMP:						
	CIMP-0	17 (47.2)	0.025	14 (66.7)	0.103	13 (39.4)	0.099
	CIMP-bajo	12 (33.3)		4 (19)		8 (24.2)	
	CIMP-alto	7 (19.4)		3 (14.3)		12 (36.4)	
	Clasificación molecular según la IMS y el CIMP:						
	IMS- CIMP-alto	5 (13.9)	0.019	2 (9.5)	0.274	0 (0)	0.035
	IMS- CIMP-0/bajo	2 (5.6)		0 (0)		0 (0)	
	EMS- CIMP-alto	2 (5.6)		1 (4.8)		12 (36.4)	
	EMS- CIMP-0/bajo	27 (75)		18 (85.7)		21 (63.6)	

n: número total de pacientes; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (X²); IMS: inestabilidad de microsatélites; EMS: estabilidad de microsatélites; CIMP: fenotipo metilador de islotes de CpG.

3.4.4. Vía de la inestabilidad cromosómica

Para este estudio fueron válidos 86 casos dentro del grupo de CCRAT, de los cuales 35 se localizaron en el colon derecho, 19 en el colon izquierdo y 32 en el recto.

En los 11 pacientes restantes la cantidad de muestra para el análisis fue insuficiente. En el grupo del CCRJ fueron válidos 60 pacientes en total, siendo excluidos los 6 individuos con criterios de PAF, junto con 22 pacientes en los que la muestra para estudio resultó insuficiente. De ellos, 13 casos se localizaron en el colon derecho, 29 en el colon izquierdo y 18 en el recto (tabla IV.13).

A nivel global, el IIG fue similar entre ambos grupos de edad, apreciándose mayor número de ganancias cromosómicas en el grupo de CCRAT. Se evidenció una ANC superior en el grupo de pacientes jóvenes (76 en el CCRJ y 46.4 en el CCRAT), con predominio global de pérdidas, mientras que la media de cromosomas completos alterados fue mayor en el grupo de CCRAT (3.36) frente al grupo de CCRJ (2).

En cuanto al análisis por localización tumoral, en el colon derecho se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en el índice de inestabilidad genómica para pérdidas y cromosomas normales, siendo el IIG claramente superior en el grupo de CCRAT, con mayor número de cromosomas normales en el grupo de pacientes jóvenes. En el colon izquierdo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el IIG, si bien el número de pérdidas fue superior en el grupo de pacientes jóvenes. En el recto, se evidenciaron mayores ganancias y cromosomas normales en el grupo de pacientes jóvenes, aunque sin diferencias estadísticamente significativas en esta localización (tabla IV.13).

Las ANC por caso fueron superiores en el grupo de pacientes jóvenes en las localizaciones derecha e izquierda, con predominio del colon izquierdo (101 en el grupo de CCRJ y 17 en el grupo de CCRAT) y predominio de pérdidas en ambos grupos de edad. Únicamente se evidenció un mayor número de ANC en el grupo de CCRAT en la localización rectal, con cifras similares de ganancias y pérdidas.

En el colon derecho, la media de cromosomas completos alterados fue mayor en el grupo de CCRAT, siendo estadísticamente significativa la diferencia respecto al grupo de jóvenes en la media de pérdidas (2.2 y 1.08, respectivamente). En el colon izquierdo, la media de cromosomas completos alterados fue claramente superior en el grupo de jóvenes, con diferencias significativas ($p=0.03$) tanto para las ganancias como para las pérdidas. En el recto, la media de cromosomas completos alterados fue algo

mayor en el grupo de CCRAT, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ni para ganancias ni para pérdidas (tabla IV.13).

En la tabla IV.13 se muestra el análisis comparativo de la inestabilidad cromosómica, según la localización tumoral, entre ambos grupos de edad.

Tabla IV. 13. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN EL CCRJ Y EN EL CCRAT SEGÚN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL

		Colon derecho <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)	Colon izquierdo <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)	Recto <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)
CCRJ	IIG:						
	Ganancias	0.113710		0.1462817		0.1627359	
	Pérdidas	0.023009		0.2294307		0.1441914	
	Normal	0.796933		0.784362		0.6930648	
	ANC por caso:	90		101		36	
	Total de ganancias	40		21		21.5	
	Total de pérdidas	49		80		14.5	
	Media de cromosomas completos alterados	1		6		3	
	Media de ganancias	1.38		2		2.37	
	Media de pérdidas	1.08		1.93		1.26	
CCRAT	IIG:						
	Ganancias	0.183649	NS	0.101056	NS	0.133332	NS
	Pérdidas	0.249820	0.003	0.114539	0.06	0.194276	NS
	Normal	0.566522	0.03	0.784362	NS	0.672383	NS
	ANC por caso:	60		17		49	
	Total de ganancias	27		5		17.5	
	Total de pérdidas	33		8		17	
	Media de cromosomas completos alterados	3		1.39		3.76	
	Media de ganancias	1.8	NS	0.78	0.03	1.67	NS
	Media de pérdidas	2.20	0.018	0.61	0.03	2.09	NS

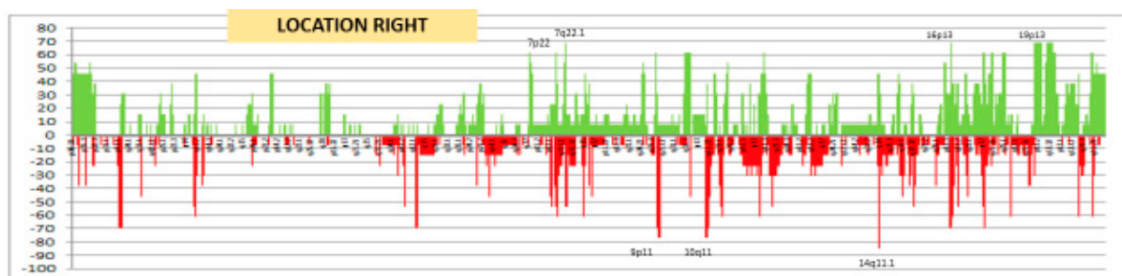
IV. RESULTADOS

n: número total de pacientes; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (χ^2); IIG: índice de inestabilidad genómica; ANC: alteración en el número de copias.

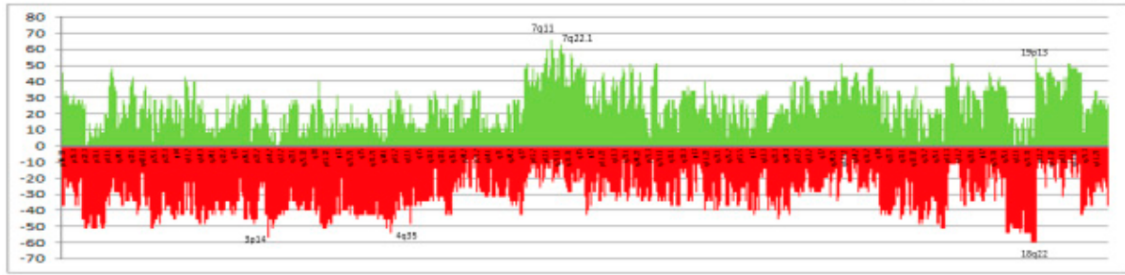
**Para este estudio fueron válidos 86 casos dentro del grupo de CCRAT, de los cuales 35 se localizaron en el colon derecho, 19 en el colon izquierdo y 32 en el recto. En el grupo del CCRJ fueron válidos 60 pacientes en total, siendo excluidos los 6 individuos con criterios de PAF, junto con 22 pacientes en los que la muestra para estudio resultó insuficiente. De ellos, 13 casos se localizaron en el colon derecho, 29 en el colon izquierdo y 18 en el recto.*

Las regiones recurrentemente alteradas (ya sean ganancias o pérdidas) en las diferentes localizaciones se encuentran reflejadas en las figuras IV.1, IV.2 y IV.3.

En el colon derecho pueden distinguirse un total de 113 regiones cromosómicas recurrentemente alteradas, de las cuales 100 se encuentran en los pacientes del grupo de CCRAT, siendo las pérdidas en el cromosoma 2 y las ganancias en el cromosoma 7 las más frecuentes. Únicamente 13 regiones alteradas fueron más frecuentes en el grupo de pacientes jóvenes, siendo en la mayoría de los casos pérdidas en 1q21.1-21.2, 10q11.21-11.22 y 14q11.1-11.2 (figura IV. 1). En el colon izquierdo, las regiones recurrentemente alteradas fueron fundamentalmente a expensas del grupo de CCRJ, siendo predominantes las pérdidas en 1p12-q21.1, 5q13.1-13.2, 9p12-q24.22, 9q31.3-33.1, 11p11.12-q12.1 y 11q14.41-14.3 y las ganancias en 19p13.12-12 (figura IV. 2). En el recto, resultaron predominantes las pérdidas en 1p36.32-36.13 y las ganancias en 5q13.2, en el grupo de CCRAT (figura IV. 3).

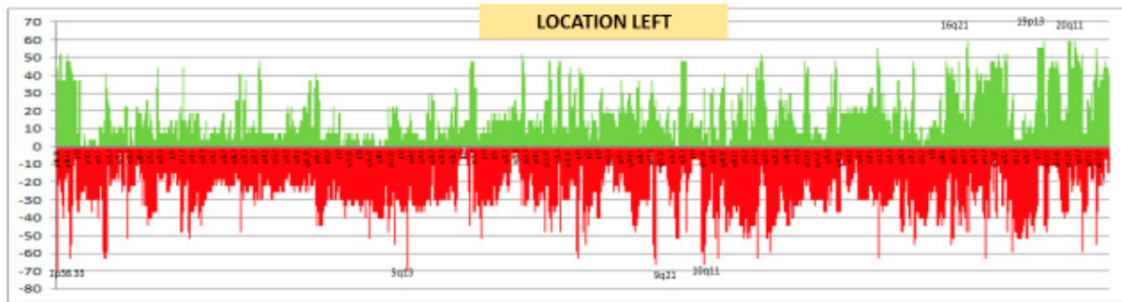


(A)

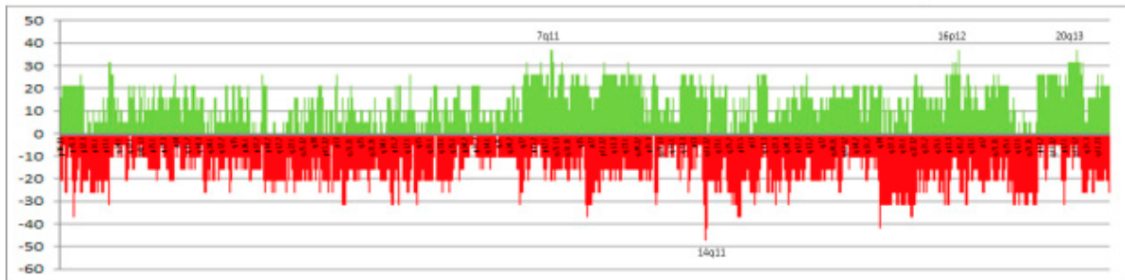


(B)

Figura IV.1. Regiones recurrentemente alteradas, ya sean pérdidas (rojo, por debajo de cero) o ganancias (verde, por encima de cero), en el colon derecho. La figura A hace referencia al grupo de CCRJ y la figura B hace referencia al grupo de CCRAT. La fracción ganada o perdida se encuentra reflejada en el eje vertical, mientras que el eje horizontal hace referencia a la localización genómica de dicha fracción.

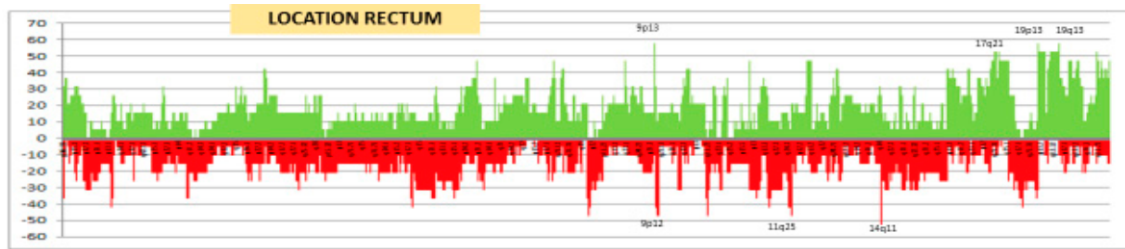


(A)

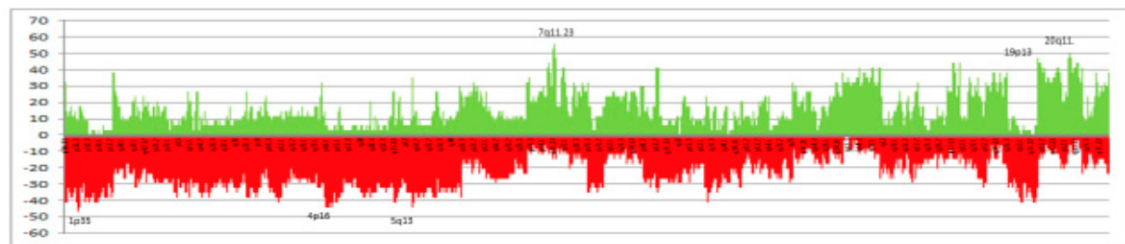


(B)

Figura IV.2. Regiones recurrentemente alteradas, ya sean pérdidas (rojo, por debajo de cero) o ganancias (verde, por encima de cero), en el colon izquierdo. La figura A hace referencia al grupo de CCRJ y la figura B hace referencia al grupo de CCRAT. La fracción ganada o perdida se encuentra reflejada en el eje vertical, mientras que el eje horizontal hace referencia a la localización genómica de dicha fracción.



(A)



(B)

Figura IV.3. Regiones recurrentemente alteradas, ya sean pérdidas (rojo, por debajo de cero) o ganancias (verde, por encima de cero), en el recto. La figura A hace referencia al grupo de CCRJ y la figura B hace referencia al grupo de CCRAT. La fracción ganada o perdida se encuentra reflejada en el eje vertical, mientras que el eje horizontal hace referencia a la localización genómica de dicha fracción.

El análisis comparativo de las regiones recurrentemente alteradas según la localización tumoral y el grupo de edad se encuentra reflejado en la tabla IV.14.

Tabla IV. 14. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS REGIONES RECURRENTEMENTE ALTERADAS EN EL CCRJ Y EN EL CCRAT SEGÚN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL

Segmento cromosómico	Colon derecho		Colon izquierdo		Recto	
	CCRJ	CCRAT	CCRJ	CCRAT	CCRJ	CCRAT
	(n=13)	(n=35)	(n=29)	(n=19)	(n=18)	(n=32)
	%	%	%	%	%	%

IV. RESULTADOS

Cromosoma 1	p32.3-22.2	0	51		
Cromosoma 1	p21.3-11.2	0	51		
Cromosoma 2	p25.2	0	51		
Cromosoma 2	p11.2	54	20		
Cromosoma 10	q11.21-11.22	70	23		
Cromosoma 14	q11.1-11.2	85	37		
Cromosoma 16	p13.12-13.11	54	11		
Cromosoma 17	p11.2	62	29		
Cromosoma 18	p11.32-11.21	0	54		
Cromosoma 18	q21.1-21.1	8	51		
Cromosoma 18	q21.31-21.33	8	54		
Cromosoma 7	q11.22-21.11	15	63		
Cromosoma 7	q22.1-31.33	15	57		
Cromosoma 7	p12.2-11.2	15	54		
Cromosoma 7	q11.21	15	54		
Cromosoma 9	q12-13	0	51		
Cromosoma 9	q33.3	62	29		
Cromosoma 9	q34.12-34.13	62	29		
Cromosoma 13	q11	8	51		
Cromosoma 21	q22.3	62	26		
Cromosoma 1	p12-q21.1		63	10	
Cromosoma 5	q13.1-13.2		67	16	
Cromosoma 9	p12-q24.22		59	21	
Cromosoma 9	q31.3-33.1		52	16	
Cromosoma 11	p11.12-q12.1		63	21	
Cromosoma 11	q14.1-14.3		59	21	
Cromosoma 15	p11.1-q11.2		0	26	
Cromosoma 9	p13.12-12		59	26	
Cromosoma 1	p36.32-36.13		5	41	
Cromosoma 1	p36.23-36.22		37	12	
Cromosoma 3	p21.31-21.1		42	32	
Cromosoma 5	q13.2		5	53	

Los porcentajes resaltados en negrita hacen referencia a las frecuencias dos veces de elevadas en un grupo de edad respecto del otro.

n: número total de pacientes; rojo: pérdidas; verde: ganancias.

3.5. Estudio de variantes somáticas en ambos grupos de edad mediante NGS (*Next Generation Sequencing*)

Para el estudio de posibles variantes somáticas en los tumores de ambos grupos de edad se utilizó un panel de 50 genes implicados en cáncer. El estudio mediante NGS se realizó en 58 casos en el grupo de CCRJ y en 86 casos en el grupo de CCRAT, debido a la pequeña cantidad de muestra de tumor en algunos casos. En la tabla IV. 15 se muestran los resultados del análisis mediante NGS para el estudio de variantes somáticas en el grupo de CCRJ y en el grupo de CCRAT.

Las mutaciones más frecuentes en el grupo de pacientes jóvenes fueron las objetivadas en los genes *APC* (48%), *P53* (43%), *KRAS* (34%) y, en menor medida, *PIK3CA* (15%), ninguna estadísticamente significativa. Las mutaciones más frecuentes en el grupo de CCRAT se evidenciaron en *KRAS* (58%), *APC* (50%), *P53* (45%) y *PIK3CA* (19%), siendo estadísticamente significativa la mutación patogénica en *KRAS* en este grupo de edad ($p=0.007$), siendo el único gen en el que se evidenciaron diferencias significativas a la hora de comparar ambos grupos de edad.

Cabe destacar la ausencia de mutaciones en determinados genes en el grupo de CCRAT que sí se evidencian en el grupo de CCRJ (*FGFR3*, *KIT*, *ATM*, *VHL*, *HRAS*, *HNF1A*, *FGFR2*, *SMO*, *STK1*). Igualmente, en el grupo de CCRJ destaca la ausencia de mutaciones en los genes *GNA11*, *CDKN2A*, *KDR*, *CDH1*, *MPL*, *GNAQ* que sí se evidenciaron en el grupo de CCRAT. No se evidenciaron mutaciones en ningún paciente de ambos grupos para los genes *AKT1*, *RB*, *NOTCH1*, *ERBB4* y *RET*, si bien estos resultados pueden estar influenciados por el bajo tamaño muestral obtenido para la realización de este análisis.

Tabla IV. 15. ANÁLISIS MEDIANTE NGS DE VARIANTES SOMÁTICAS EN CCRJ Y CCRAT				
		CCRJ <i>n</i> (%)	CCRAT <i>n</i> (%)	<i>p</i> (X ²)
<i>KRAS</i>	Mutación	20 (34)	50 (58)	0.007
	Negativo	38 (66)	35 (42)	
<i>APC</i>	Mutación	28 (48)	43 (50)	0.9
	Negativo	30 (52)	43 (50)	

IV. RESULTADOS

<i>BRAF</i>	Mutación	3 (5)	6 (7)	0.7
	Negativo	55 (95)	80 (93)	
<i>P53</i>	Mutación	25 (43)	39 (45)	0.9
	Negativo	33 (57)	47 (55)	
<i>PIK3CA</i>	Mutación	9 (15)	16 (19)	0.7
	Negativo	49 (85)	70 (81)	
<i>NRAS</i>	Mutación	3 (5)	6 (7)	0.7
	Negativo	55 (95)	80 (93)	
<i>GNAS</i>	Mutación	3 (5)	6 (7)	0.7
	Negativo	55 (95)	80 (93)	
<i>FBXW7</i>	Mutación	4 (7)	7 (8)	1
	Negativo	54 (93)	79 (92)	
<i>SMAD4</i>	Mutación	4 (7)	8 (9)	0.8
	Negativo	54 (93)	78 (91)	
<i>PTEN</i>	Mutación	3 (5)	2 (2)	0.4
	Negativo	55 (95)	84 (98)	
<i>FGFR3</i>	Mutación	2 (3)	0 (0)	0.2
	Negativo	56 (97)	86 (100)	
<i>IDH2</i>	Mutación	1 (2)	1 (1)	1
	Negativo	57 (98)	85 (99)	
<i>AKT1</i>	Mutación	0 (0)	0 (0)	-
	Negativo	58 (100)	86 (100)	
<i>CTNNB1</i>	Mutación	2 (3)	2 (2)	1
	Negativo	56 (97)	84 (98)	
<i>KIT</i>	Mutación	1 (2)	0 (0)	0.2
	Negativo	57 (98)	86 (100)	
<i>ATM</i>	Mutación	2 (3)	0 (0)	0.2
	Negativo	56 (97)	86 (100)	
<i>VHL</i>	Mutación	2 (3)	0 (0)	0.2
	Negativo	56 (97)	86 (100)	
<i>RB</i>	Mutación	0 (0)	0 (0)	-
	Negativo	58 (100)	86 (100)	
<i>GNAI1</i>	Mutación	0 (0)	1 (1)	1
	Negativo	58 (100)	85 (99)	
<i>HRAS</i>	Mutación	2 (3)	0 (0)	0.2
	Negativo	56 (97)	86 (100)	
<i>NOTCH1</i>	Mutación	0 (0)	0 (0)	-

IV. RESULTADOS

	Negativo	58 (100)	86 (100)	
<i>HNF1A</i>	Mutación	1 (2)	0 (0)	0.4
	Negativo	57 (98)	86 (100)	
<i>FGFR2</i>	Mutación	1 (2)	0 (0)	0.4
	Negativo	57 (98)	86 (100)	
<i>ERBB4</i>	Mutación	0 (0)	0 (0)	-
	Negativo	58 (100)	58 (100)	
<i>SMO</i>	Mutación	1 (2)	0 (0)	0.4
	Negativo	57 (98)	86 (100)	
<i>RET</i>	Mutación	0 (0)	0 (0)	-
	Negativo	58 (100)	86 (100)	
<i>SMARCB1</i>	Mutación	1 (2)	1 (1)	1
	Negativo	57 (98)	85 (99)	
<i>CDKN2A</i>	Mutación	0 (0)	3 (4)	0.3
	Negativo	58 (100)	83 (96)	
<i>KDR</i>	Mutación	0 (0)	2 (2)	0.5
	Negativo	58 (100)	84 (98)	
<i>CDH1</i>	Mutación	0 (0)	1 (1)	1
	Negativo	58 (100)	85 (99)	
<i>MPL</i>	Mutación	0 (0)	1 (1)	1
	Negativo	58 (100)	85 (99)	
<i>GNAQ</i>	Mutación	0 (0)	1 (1)	1
	Negativo	58 (100)	85 (99)	
<i>STK11</i>	Mutación	1 (2)	0 (0)	0.4
	Negativo	57 (98)	86 (100)	

n: número total de pacientes; *p*: grado de significación estadística según el test de Chi cuadrado (χ^2).

* El estudio mediante NGS se realizó en 58 casos en el grupo de CCRJ y en 86 casos en el grupo de CCRAT, debido al pequeño tamaño de la muestra de tumor en varios casos.

** Se muestra el valor estadístico de *p* obtenido tras realizar la prueba estadística del Test exacto de Fisher para variables categóricas no paramétricas.

En el análisis comparativo por localizaciones, únicamente fue significativo el análisis de *KRAS* en el grupo de CCRAT, evidenciándose 22 mutaciones en el colon derecho (73% de los casos con localización derecha en este subgrupo), 6 mutaciones en el colon izquierdo (28%) y 22 mutaciones en el recto (63%) ($p=0.005$). En el grupo

de CCRJ, se evidenciaron 7 mutaciones en *KRAS* en el colon derecho (58%), 8 mutaciones en el colon izquierdo (26%) y 5 mutaciones en el recto (33%), no evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre las 3 localizaciones.

4. Resumen de los resultados según la localización tumoral

Atendiendo a los resultados obtenidos previamente de las características clínicas, familiares, anatomopatológicas y moleculares del CCR en ambos grupos de edad y, teniendo en cuenta los resultados estadísticamente significativos o especialmente relevantes en este análisis, se puede establecer una clasificación desde el punto de vista de la localización tumoral del CCRJ y el CCRAT.

Las tablas IV.15, IV.16 y IV.17 describen las características más relevantes obtenidas en el colon derecho, el colon izquierdo y el recto, tras el análisis comparativo entre el CCRJ y el CCRAT.

Tabla IV. 16. RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN EL CÁNCER DE COLON DERECHO SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN

	CCRJ	CCRAT	<i>p</i> (X ²)
Edad media (años)	39.1	79.08	
Sexo	Mujer/Varón	Mujer	NS
Supervivencia global (meses)	180.03	45.94	0.003
Supervivencia libre de enfermedad (meses)	72.4	31.68	0.002
Recidiva tumoral (%)	21.1	20	NS
Mortalidad global a 5 años (%)	10	33.3	0.062
Pólipos asociados	Si (70%)	Si (63.2 %)	NS
Número de pólipos (DE)	3 (3.2)	1.78 (2.17)	NS
Tipo de pólipos	Mixtos (50%)	Adenomatosos (54.2%)	NS

IV. RESULTADOS

Neoplasias primarias múltiples	No (Si 25%)	No (Si 39.5%)	NS
CCR sincrónico y/o metacrónico	No (Si 20%)	No (Si 23.7%)	NS
Antecedentes familiares de cáncer:			
Ámsterdam II	Si (40%)	No (Si 2.7%)	<0.001
Neoplasias relacionadas con SL	Si (35%)	No (Si 15.8%)	0.008
Neoplasias no relacionadas con SL	No (Si 5%)	No (Si 2.7%)	0.456
Casos esporádicos	No (Si 20%)	Si (73.7%)	<0.001
Estadio tumoral (AJCC/TNM)	II (60%)	II (57.9%)	NS
Grado de diferenciación	Bajo	Moderado	NS
Componente mucinoso	No (Si 37.5%)	No (Si 34.3%)	NS
Células en anillo de sello	No (Si 0%)	No (Si 0%)	NS
IMS	EMS (IMS 30%)	EMS (IMS 18.4%)	NS
Mutación en genes MMR	No (Si 30%)	No (Si 2.6%)	0.002
Mutación en <i>BRAF</i>	No (Si 0%)	No (Si 13.2%)	NS
CIMP	CIMP-alto	CIMP-0	0.025
Clasificación molecular según la IMS y el CIMP	EMS- CIMP-alto/ EMS- CIMP-0/bajo	EMS- CIMP-0/bajo	0.019
IIG:			
Ganancias	0.113710	0.183649	NS
Pérdidas	0.023009	0.249820	0.003
Normal	0.796933	0.566522	0.03

Los datos resaltados en negrita hacen referencia a los resultados estadísticamente significativos.

DE: desviación estándar; IMS: inestabilidad de microsatélites; EMS: estabilidad de microsatélites; genes MMR: genes reparadores de ADN; CIMP: fenotipo metilador de islotes de CpG; IIG: índice de inestabilidad genómica.

Tabla IV. 17. RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN EL CÁNCER DE COLON IZQUIERDO SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN

	CCRJ	CCRAT	p (X ²)
Edad media (años)	39.3	74.86	
Sexo	Varón	Varón	NS
Supervivencia global (meses)	76.67	96.95	NS
Supervivencia libre de enfermedad (meses)	48.7	31.68	NS
Recidiva tumoral (%)	11.5	12.5	NS
Mortalidad global a 5 años (%)	28.6	19	NS
Pólipos asociados	Si (60%)	Si (59.1%)	NS
Número de pólipos (DE)	1.6 (1.9)	5.41 (7.67)	<0.001
Tipo de pólipos	Adenomatosos (48%)	Adenomatosos/Mixtos (53.8/46.2%)	NS
Neoplasias primarias múltiples	No (Si 11%)	No (Si 40.9%)	NS
CCR sincrónico y/o metacrónico	No (Si 0%)	No (Si 36.4%)	<0.001
Antecedentes familiares de cáncer:			
Ámsterdam II	No (Si 17.1%)	No (Si 0%)	0.115
Neoplasias relacionadas con SL	No (Si 17%)	Si (27.3%)	0.049
Neoplasias no relacionadas con SL	No (Si 17%)	No (Si 9.1%)	0.349
Casos esporádicos	Si (48%)	Si (55.5%)	0.883
Estadio tumoral (AJCC/TNM)	I/II (34/34%)	III (45.5%)	0.003
Grado de diferenciación	Moderado (50%)	Moderado (77.3%)	NS
Componente mucinoso	No (Si 33%)	No (Si 9.1%)	NS
Células en anillo de sello	No (Si 8%)	No (Si 0%)	NS

IV. RESULTADOS

IMS	EMS (IMS 17%)	EMS (IMS 9.1%)	NS
Mutación en genes MMR	No (Si 11%)	No (Si 0%)	NS
Mutación en <i>BRAF</i>	No (Si 3.2%)	No (Si 4.5%)	NS
CIMP	CIMP-0/CIMP-bajo	CIMP-0	NS
Clasificación molecular según la IMS y el CIMP	EMS- CIMP-0/bajo	EMS- CIMP-0/bajo	NS
IIG:			
Ganancias	0.1462817	0.101056	NS
Pérdidas	0.2294307	0.114539	0.06
Normal	0.784362	0.784362	NS

Los datos resaltados en **negrita** hacen referencia a los resultados estadísticamente significativos.

DE: desviación estándar; IMS: inestabilidad de microsatélites; EMS: estabilidad de microsatélites; genes MMR: genes reparadores de ADN; CIMP: fenotipo metilador de islotes de CpG; IIG: índice de inestabilidad genómica.

Tabla IV. 18. RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN EL CÁNCER DE RECTO SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN

	CCRJ	CCRAT	<i>p</i> (X ²)
Edad media (años)	40.2	78.54	
Sexo	Varón	Varón	NS
Supervivencia global (meses)	64.79	31.67	<0.001
Supervivencia libre de enfermedad (meses)	36.7	16.25	<0.001
Recidiva tumoral (%)	17.6	10	NS
Mortalidad global a 5 años (%)	48.1	36.4	NS
Pólipos asociados	No (Si 41%)	Si (67.6%)	0.040
Número de pólipos (DE)	1.2 (2.3)	2.0 (3.52)	NS
Tipo de pólipos	Adenomatosos (64%)	Adenomatosos (72%)	NS
Neoplasias primarias múltiples	No (Si 7%)	No (Si 24.3%)	NS

IV. RESULTADOS

CCR sincrónico y/o metacrónico	No (Si 4%)	No (Si 10.8%)	NS
Antecedentes familiares de cáncer:			
Ámsterdam II	No (Si 3.7%)	No (Si 0%)	NS
Neoplasias relacionadas con SL	Si (51.8%)	No (Si 0%)	<0.001
Neoplasias no relacionadas con SL	No (Si 7.4%)	No (Si 8.1%)	0.535
Casos esporádicos	No (Si 37%)	Si (91.9%)	<0.001
Estadio tumoral (AJCC/TNM)	IV (37%)	II (50%)	0.002
Grado de diferenciación	Moderado (65%)	Moderado (78.8%)	NS
Componente mucinoso	No (Si 10%)	No (Si 11.8%)	NS
Células en anillo de sello	No (Si 10%)	No (Si 5.9%)	NS
IMS	EMS (IMS 0%)	EMS (IMS 0%)	NS
Mutación en genes MMR	No (Si 0%)	No (Si 0%)	NS
Mutación en <i>BRAF</i>	No (Si 0%)	No (Si 2.7%)	NS
CIMP	CIMP-0	CIMP-0/CIMP-alto	0.099
Clasificación molecular según la IMS y el CIMP	EMS- CIMP-0/bajo	EMS- CIMP-0/bajo	0.035
IIG:			
Ganancias	0.1627359	0.133332	NS
Pérdidas	0.1441914	0.194276	NS
Normal	0.6930648	0.672383	NS

Los datos resaltados en negrita hacen referencia a los resultados estadísticamente significativos.

DE: desviación estándar; IMS: inestabilidad de microsatélites; EMS: estabilidad de microsatélites; genes MMR: genes reparadores de ADN; CIMP: fenotipo metilador de islotes de CpG; IIG: índice de inestabilidad genómica.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El CCR es el tercer cáncer más frecuente y supone la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en el mundo (Bray F, Ferlay J *et al.*, 2018). En los últimos años, la incidencia del CCR esporádico y su mortalidad asociada han disminuido (Malvezzi M *et al.*, 2018), probablemente favorecido por el esfuerzo creciente en el desarrollo e implementación en las últimas décadas de los sistemas de *screening* que han permitido la detección y el tratamiento de las lesiones premalignas y de las lesiones malignas en etapas precoces de la enfermedad (Holme Ø *et al.*, 2013; Siegel RL *et al.*, 2017). No obstante, a pesar de estas importantes mejoras en el diagnóstico y tratamiento, en las últimas décadas se ha evidenciado un aumento de la incidencia del CCR esporádico en individuos menores de 50 años (Siegel RL *et al.*, 2018; Bailey CE *et al.*, 2015). Hoy en día, el CCRJ supone aproximadamente el 10-15% del total de los diagnósticos de CCR (Stoffel EM *et al.*, 2020), estimándose el doble de dicha incidencia en el año 2030 (Bailey CE *et al.*, 2015).

A diferencia del CCRJ, el CCRAT (aquel diagnosticado en individuos mayores de 70 años) ha presentado una notable disminución en su incidencia y mortalidad en las últimas décadas (Siegel RL *et al.*, 2017). Este descenso se ha atribuido fundamentalmente a la mejora en los programas de *screening* y a los avances en el tratamiento global del CCR (Tong L *et al.*, 2014).

Debido al aumento en la incidencia y mortalidad en el grupo de pacientes jóvenes, desde hace varios años existe un especial interés en el análisis y descripción de las diferencias clínicas, patológicas y moleculares entre ambos grupos de edad. Los pacientes con CCRJ suelen presentar tumores más avanzados, de localización predominantemente distal, con pobres patrones histológicos (como la alta presencia de células en anillo de sello) y predominio de la IMS a nivel molecular (Aherne ST *et al.*, 2015; Yantiss RK *et al.*, 2009; Goel A *et al.*, 2010). A diferencia de estos, el CCRAT presenta un predominio de localización derecha y rectal, con tumores mejor diferenciados (aunque elevada proporción de componente mucinoso) y estadios menos avanzados de la enfermedad al diagnóstico, con bajo índice de IMS (la mayoría, asociados a mutaciones en *BRAF*) y predominio del fenotipo metilador (Perea J *et al.*, 2014; Kirzin S *et al.*, 2014).

Además de estas diferencias entre ambos grupos de edad, también se han descrito importantes diferencias en función de la localización tumoral dentro del colon independientemente de la edad de aparición. Las localizaciones derechas son más frecuentes en mujeres, con predominio de lesiones sésiles serradas y tumores mucinosos. Presentan elevada frecuencia de IMS-alta y CIMP, con mutaciones en *BRAF* y, ocasionalmente, en *KRAS* (en el caso del CIMP). En contraste, las localizaciones izquierdas son más frecuentes en varones, con predominio de IC y mutaciones en *TP53* y *APC*.

El conocimiento de estas diferencias entre ambos grupos de edad, así como su localización tumoral, es fundamental para el manejo de los pacientes diagnosticados de CCR, pudiendo considerar cada caso como una entidad diferente dentro del espectro del CCR.

1. Pacientes con CCR de aparición tardía

El CCRAT, aquel diagnosticado en individuos mayores de 70 años, como se ha indicado previamente, presenta importantes diferencias con respecto al CCRJ. Mientras que el CCRJ se caracteriza por la presencia de una mayor proporción de síndromes hereditarios predisponentes a cáncer, como el SL, el CCRAT asocia un mayor número de alteraciones epigenéticas, una elevada susceptibilidad a la carcinogénesis y una mayor mortalidad global (relacionada y no relacionada con cáncer) debido, en parte, a las comorbilidades asociadas y menor uso de tratamientos adyuvantes en este grupo de edad (Berger NA *et al.*, 2006).

Aunque en la actualidad existe una preocupación creciente acerca del aumento de los casos de CCRJ, el CCRAT sigue suponiendo la mayoría de los diagnósticos de CCR y es relevante la falta de estudios específicos en este grupo de edad, con la necesidad de definir sus características clínico-patológicas y sus factores pronósticos para ayudarnos a guiar la toma de decisiones en el tratamiento de estos pacientes, al igual que ocurre en el grupo de jóvenes (Zhao M *et al.*, 2017).

1.1. Características globales del CCRAT.

Las características globales de nuestros pacientes con CCRAT, sin incluir la localización tumoral, fueron en su mayoría coincidentes con las ya conocidas y publicadas en este grupo de edad (Pilozzi E *et al.*, 2015; Zaborowski AM *et al.*, 2021).

La edad media al diagnóstico fue de 77.92 años, con equivalencia entre ambos sexos. La localización tumoral más frecuente fue el colon derecho y el recto (39 y 38%, respectivamente), datos similares con lo publicado por Patel SS *et al.* (2012) en una serie de más de 20.000 pacientes en la que predominan los tumores de colon derecho (55%) y colon descendente (42.1%), con menor frecuencia del colon transverso. La mortalidad a 5 años global, relacionada y no relacionada con cáncer, fue del 30.9%, índice muy variable, según las series, entre el 25 y el 49% (Burnett-Hartmann A *et al.*, 2019; Rho YS *et al.*, 2017), probablemente relacionada con el menor esfuerzo terapéutico en este grupo de edad.

Existe una importante asociación con la presencia de pólipos previamente al diagnóstico de cáncer o durante el seguimiento (aproximadamente en el 70% de los pacientes), lo cual pone en evidencia el mayor número de alteraciones epigenéticas acumulativas y fenómenos de carcinogénesis en este grupo de edad y en formas esporádicas de CCR, datos similares a los publicados en otras series de pacientes ancianos y con antecedentes de CCR (Chang DT *et al.*, 2012), con un predominio de pólipos adenomatosos (61%). Igualmente, se objetivó una elevada proporción de CCR sincrónico y metacrónico durante el tiempo de seguimiento.

En cuanto a los antecedentes familiares, el 80% de los pacientes no presentaron antecedentes familiares de neoplasias relacionadas y no relacionadas con SL, siendo diagnosticados de CCR de tipo esporádico, datos similares a los publicados por Rho YS *et al.* (2017), con un 14% de antecedentes familiares en una serie de 498 pacientes con CCRAT.

A pesar de la implementación en la mayoría de los sistemas sanitarios de programas de *screening* en este grupo de edad, un 45% de nuestros pacientes fueron diagnosticados en estadios avanzados (III y IV), datos también similares a los publicados por Rho YS *et al.* (2017), donde el 55% de los pacientes se encontraban en

estadio III al diagnóstico. A nivel histopatológico, una de las principales características en este grupo de edad fue la baja presencia de tumores con bajo grado de diferenciación (4%), aunque es llamativa la elevada presencia de componente mucinoso (19.8%), lo cual puede explicar en parte el peor pronóstico en este grupo de edad.

En cuanto a las características moleculares, la baja proporción de IMS se encuentra en consonancia con la mayoría de los casos esporádicos esperables, objetivándose IMS en el 9.3% de los pacientes, la mayoría asociados a mutaciones en *BRAF*^{V600E} (Giannakis M *et al.*, 2014; Rajagopalan H *et al.*, 2002). En cuanto al fenotipo metilador, como se preveía, los casos de CIMP-alto se encontraban en relación con los casos de IMS de tipo esporádico (Chan AO-O *et al.*, 2002). En el 73% de los pacientes con CCRAT los tumores fueron de tipo EMS-CIMP-0/bajo. La ausencia de una región predominantemente alterada en el análisis mediante arrays de CGH, con una CNA por caso menor del 50%, también habla acerca de la heterogeneidad en este grupo. Algunas de estas alteraciones han sido estudiadas previamente en el CCR, aunque sin una distinción basada en la edad, como las pérdidas en 5q13 o las alteraciones en 7q21, asociadas con una escasa respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en el cáncer rectal (Molinari C *et al.*, 2011).

1.2. Características del CCRAT, según su localización tumoral.

1.2.1. Características clínicas, familiares y anatomopatológicas del CCRAT, según su localización tumoral.

De los pacientes estudiados, el 39% presentaban cáncer de colon derecho y el 38% cáncer de recto, siendo la localización izquierda la menos frecuente, datos similares a los encontrados en otras series (Rho YS *et al.*, 2017, Zhao M *et al.*, 2017, Patel SS *et al.*, 2012). En cuanto a la distribución por sexo, se objetivó un predominio femenino en la localización derecha (el 65.8% de los tumores de colon derecho fueron mujeres), con diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de localizaciones, predominando los varones en los tumores de localización izquierda y rectal. Patel SS *et al.* (2012) describe en su serie un predominio masculino hasta la edad de 79 años, siendo femenino (60,3%) a partir de los 80 años, aunque estas diferencias

probablemente se encuentren en relación con la mayor esperanza de vida global de las mujeres.

La edad media al diagnóstico fue estadísticamente significativa en los tumores de colon izquierdo, como aquellos diagnosticados a menor edad (74 años), frente a 79 años en el caso de tumores derechos y 78.5 años en tumores de recto. El motivo de este hallazgo es desconocido, probablemente asociado a la mayor proporción de pólipos en esta localización (lo cual motiva un seguimiento más estrecho en el *screening*), con menor componente mucinoso y menor estado de metilación a nivel molecular. Estas diferencias también pueden observarse en términos de mortalidad global y supervivencia, siendo la SG en meses claramente menor en los pacientes con cáncer de recto y con cáncer de colon derecho (31.6 y 45.9 meses, respectivamente), respecto a los tumores izquierdos. Esta diferencia es estadísticamente significativa en el caso de los tumores rectales, que muestran la peor SG ($p=0.024$). La SLE en meses fue muy similar en los grupos de cáncer de colon derecho e izquierdo y claramente inferior en el grupo de cáncer de recto (16 meses), aunque no estadísticamente significativa. Shimada Y *et al.* (2017) en su estudio acerca de las diferencias entre CCR derecho e izquierdo (sin hacer distinción en función de la edad) también publica peores resultados globales entre ambas localizaciones, con diferencias clínicas y moleculares similares a las objetivadas en nuestra serie. El porcentaje de pacientes con recidiva tumoral a 5 años fue menor en el grupo de cáncer de recto, probablemente en relación con la menor SLE y SG, aunque no estadísticamente significativa, al igual que la mortalidad a 5 años, mayor en el grupo de cáncer de recto (36.4%) y cáncer de colon derecho (33%), respecto a los tumores izquierdos (19%).

El número de pólipos al diagnóstico o durante el seguimiento, como se ha comentado previamente, fue mayor en la localización izquierda (5.4 pólipos), respecto al colon derecho (1.78 pólipos) y el recto (2 pólipos), aunque no estadísticamente significativo. El mayor número de pólipos asociados fue de tipo adenomatoso, especialmente en la localización rectal (72%), seguidos de los pólipos mixtos y, prácticamente anecdóticos, los hiperplásicos, siendo llamativa la ausencia de estos en la localización izquierda, con diferencias no significativas. El predominio de pólipos adenomatosos con bajo índice de pólipos hiperplásicos coincide con lo publicado en otras series (Pilozzi E *et al.*, 2015). Los tumores derechos presentan mayor proporción de adenomas sésiles serrados y adenocarcinomas mucinosos, mientras que los

tumores izquierdos presentan predominio de adenocarcinomas tradicionales vellosos (Marzouk O y Schofield J, 2011), lo que puede encontrarse en relación con la ausencia de pólipos hiperplásicos en la localización izquierda, con mayor presencia en la localización derecha. Los pólipos hiperplásicos se engloban dentro del grupo de los pólipos serrados y se caracterizan por presentar CIMP-alto, mutación en *BRAF* e IMS, características que fueron más frecuentes en nuestra serie precisamente en las localizaciones derecha y rectal.

La incidencia de neoplasias primarias múltiples se encuentra entre el 5 y el 10%, según las series (Rennert G *et al.*, 1995). El CCR sincrónico de localización derecha parece estar relacionado principalmente con formas hereditarias y fenotipo metilador, en la localización izquierda existe un predominio de la IC y en los casos de afectación colónica global, la IC y las mutaciones germinales en *APC* y *MUTYH* suelen ser prevalentes (Brandariz L *et al.*, 2016). En nuestra serie, el CCR sincrónico y/o metacrónico fue más frecuente en la localización izquierda (36.4%), siendo menos frecuente en la localización rectal (11.1%), aunque con diferencias no estadísticamente significativas. Estos datos pueden encontrarse en relación con el mayor número de pólipos asociados en la localización izquierda y coinciden con los datos publicados por nuestro grupo (Brandariz L *et al.*, 2016). No obstante, lo más llamativo de nuestra serie es la alta prevalencia global de neoplasias primarias múltiples (incluyendo el CCR sincrónico y/o metacrónico), siendo diagnosticadas en el 34% de los pacientes con mayor incidencia en el colon izquierdo (41%), seguido del colon derecho (39.5%), porcentajes mayores a los reflejados en la literatura y con una explicación no del todo clara, si bien probablemente se encuentre en relación con el seguimiento más estrecho realizado a estos pacientes.

La mayoría del CCR es de tipo esporádico, aunque muchos pacientes, sobre todo en el caso del CCRJ, serán diagnosticados en el contexto de síndromes de CCR hereditario. Las mutaciones germinales en genes que predisponen al desarrollo de CCR suponen aproximadamente el 5% de todos los diagnósticos de CCR (Ogino S *et al.*, 2008), aunque se estima que hasta un 20% de los pacientes presentan agregación familiar para el CCR sin diagnóstico de síndromes hereditarios, con bases moleculares aún por definir (Lindor NM *et al.* 2006). A nivel global, la mayoría de nuestros pacientes presentaron tumores de tipo esporádico (80.4%). La mayor agregación familiar se objetivó en los tumores de colon izquierdo (45.5%), con diferencias estadísticamente

significativas respecto a la localización rectal, donde el 92% de los tumores fueron esporádicos. Aunque únicamente se evidenció un caso que cumplía criterios de Ámsterdam para SL no conocido previamente, de localización derecha, la mayor proporción de tumores relacionados con SL se encontraron en la localización izquierda (27.3%), probablemente por la mayor agregación familiar en este grupo de pacientes. En relación con el mayor componente esporádico en la localización rectal, llama la atención la ausencia total de neoplasias relacionados con SL en esta localización, con un 8% de neoplasias no relacionadas con SL. El colon derecho presentó un componente familiar intermedio, con un 16% de diagnóstico de neoplasias relacionadas con SL y un 3% de neoplasias no relacionadas con SL. En nuestra serie, la mayoría de los tumores izquierdos son EMS/CIMP0-bajo, con mayor estabilidad cromosómica, ausencia de mutaciones en genes MMR y baja proporción de mutaciones en *BRAF*, lo cual contrasta con la mayor agregación familiar objetivada en este grupo y pone de manifiesto las alteraciones moleculares pendientes de definir en estos pacientes.

A nivel histopatológico, es llamativo el elevado componente mucinoso objetivado en la localización derecha (34%) y estadísticamente significativo respecto al resto de localizaciones, con ausencia de células en anillo de sello en el colon derecho e izquierdo, siendo estas relevantes (5.9%) en la localización rectal. Nitsche U *et al.* (2016) tras analizar una cohorte de 28.056 pacientes con diagnóstico de CCR describe mayor prevalencia de tumores mucinosos y con células en anillo de sello en las localizaciones derecha y rectal, respectivamente. En su serie, en la que no se realiza distinción en cuanto a la edad de los pacientes, la incidencia de tumores mucinosos es del 11%, mientras que la incidencia de células en anillo de sello es del 0.9%, datos inferiores a los objetivados en nuestra serie de pacientes con CCRAT. Los tumores con componente mucinoso presentaron bajo grado de invasión linfática pero elevada invasión locorregional y recidivas locales, mientras que los tumores con presencia de células en anillo de sello presentaron mayor invasión linfática, metástasis a distancia y tumores metacrónicos. El mecanismo molecular no se encuentra del todo descrito, si bien tanto el componente mucinoso como las células en anillo de sello se encuentran relacionados con la presencia de IMS, mutaciones en *BRAF*, *p53* y *p16*, hallazgos también prevalentes a nivel molecular en las localizaciones derecha y rectal en nuestra serie. Como era de esperar, estos tumores presentaron peor estadificación TNM al diagnóstico, mayor índice de invasión linfática y peor grado de diferenciación. Estos datos concuerdan con los hallados en nuestra serie y explican en parte los peores datos en términos de SG y SLE en dichas localizaciones, especialmente en la localización

rectal. En relación con estos hallazgos, la mayor proporción de pacientes diagnosticados en estadio IV se encontró en la localización rectal (27.8%), seguido de la localización derecha (15.8%), aunque la mayoría de los pacientes en los tres grupos fueron diagnosticados en estadios intermedios (II y III). La mayoría de los tumores en las tres localizaciones presentaron moderado grado de diferenciación, con mayor prevalencia de tumores pobremente diferenciados en la localización derecha (8.6%), probablemente asociados al mayor componente mucinoso, sin evidenciar ningún tumor pobremente diferenciado en la localización izquierda, aunque no estadísticamente significativo pero similar a lo publicado en otras series (Patel SS *et al.* 2012).

1.2.2. Características moleculares del CCRAT, según su localización tumoral.

La mayoría de los pacientes con CCRAT serán estables desde el punto de vista de los microsatélites, lo cual refuerza el esperable carácter esporádico en este grupo de edad, con elevada presencia de fenotipo metilador (Jass RJ *et al.*, 2000). En nuestra serie, el 90.7% de los pacientes presentaron estabilidad de microsatélites. Entre los pocos pacientes inestables, se evidenció un claro predominio en la localización derecha (18.4%), respecto al resto de localizaciones, con diferencias estadísticamente significativas. Corso G *et al.* (2013) en su serie de 280 pacientes con CCR también describe una significativa predominancia de la IMS en la localización derecha, la cual se asocia además con alteraciones en el EGFR producidas por mutaciones en *BRAF*^{V600E} y *KRAS*, considerándose, por tanto, casos esporádicos, no relacionados con SL. En nuestra serie, de los 9 pacientes con IMS, 7 de ellos se encontraron asociados a mutaciones en *BRAF*^{V600E} o hipermetilación en su promotor, la mayoría de ellos en el grupo de tumores derechos, suponiendo un 13.2% de los pacientes de esta localización, similar a lo descrito en otras series. Reforzando el carácter esporádico del CCRAT, únicamente se evidenció un caso, también de localización derecha, con mutación germinal en el gen *MSH2*, con ausencia de mutación en genes MMR en el resto de las localizaciones, similar a lo publicado por Corso G *et al.* (2013).

Se estima que aproximadamente el 15% del CCR asienta sobre un pólipo serrado como lesión precursora, desarrollándose a través de la vía serrada (Toyota M *et al.*, 1999). Aunque los mecanismos moleculares que subyacen en el CIMP no se encuentran claramente establecidos, estos suelen asociarse con mutaciones en *BRAF* e hipermetilación en *MLH1*, características compartidas con los tumores con IMS-alta

(Chan AO-O *et al.*, 2002). A pesar de que el CIMP se puede observar en muchos tumores esporádicos con IMS-alta, su presencia no solo se restringe a los tumores con IMS-alta, ya que aproximadamente la mitad de los tumores con CIMP no presentarán metilación en *MLH1* o IMS (Samowitz WS *et al.*, 2005). En nuestra serie, la localización rectal fue aquella con mayor estado de metilación, con un 36.4% de los tumores rectales de tipo CIMP-alto. Clásicamente, se ha considerado que los tumores desarrollados a través de esta vía eran predominantes en mujeres, en localizaciones proximales del colon, con peores grados de diferenciación y una elevada frecuencia de mutaciones en *BRAF*, lo cual contrasta con el predominio de la localización rectal en nuestra serie. Igualmente, los tumores de colon izquierdo destacaron por presentar menor estado de metilación respecto al resto de localizaciones, lo cual coincide con la ausencia de pólipos hiperplásicos en esta localización y contrasta con lo publicado en algunas series, donde la localización izquierda fue aquella con mayor estado de hipermetilación (Ogino S *et al.*, 2007). De forma habitual, los pacientes con SL han sido incluidos dentro del grupo del CIMP-bajo, mientras que los tumores con IMS de tipo esporádico han sido más frecuentes en el grupo de CIMP-alto, con elevados índices de mutaciones en *BRAF* (Ogino A, Goel A, 2008). En nuestra serie se confirman estos hallazgos, la mayoría de los pacientes con IMS-CIMP-alto fueron encontrados en la localización derecha, en relación con la mayor frecuencia de mutaciones en *BRAF*. Aunque los tumores rectales presentaron mayor estado de metilación respecto al resto de localizaciones, a nivel global en las tres localizaciones fue prevalente el CIMP-0, destacando el bajo nivel de metilación global en los pacientes de edad avanzada.

Ogino S y Goel A, en el año 2008, establecieron la clasificación del CCR según las dos principales vías de carcinogénesis, la IMS y la vía serrada, en 4 tipos de pacientes, como hemos señalado anteriormente:

1. Los tumores con IMS-CIMP-alto se asocian frecuentemente con mutaciones en *BRAF* e hipermetilación de *MLH1*, pobre diferenciación y elevada frecuencia de mucina y células en anillo de sello. En estos pacientes, la IMS es de tipo esporádico, con elevada frecuencia de mujeres, de edad avanzada y con tumores de localización proximal.
2. Los pacientes con SL se encuentran englobados en el grupo de tumores con IMS-CIMP-0/bajo, también con predominio de localizaciones derechas y componente mucinoso, pero con tumores mejor diferenciados de forma global.

3. El grupo de tumores con EMS-CIMP-alto mostrarán mutaciones en *BRAF*, pobre diferenciación y presencia de células en anillo de sello, con predominio de mujeres, edades avanzadas y tumores de localización derecha.
4. Los tumores de tipo EMS-CIMP-0/bajo son los más frecuentes a nivel global, suponiendo aproximadamente el 80% de los tumores colorrectales. Presentan características histopatológicas variadas, si bien son más frecuentes en varones y en localizaciones distales en el colon.

En nuestra serie, la mayoría de los pacientes fueron EMS-CIMP-0/bajo en las tres localizaciones, aunque a nivel rectal fue estadísticamente significativa la presencia de tumores EMS-CIMP-alto (36,4%), en relación con el mayor estado de metilación encontrado en esta localización. Los tumores con EMS-CIMP alto fueron predominantemente mujeres, en localización derecha, con elevada presencia de mucina y asociados a mutaciones en *BRAF*, hallazgos en correlación con la clasificación de Ogino y Goel. Los tumores con EMS-CIMP alto también presentaron elevada proporción de mutaciones en *BRAF*, siendo más frecuentes en localización izquierda y rectal. El grupo predominante fue el de los tumores EMS-CIMP-0/bajo (73%) con predominio masculino y elevado componente mucinoso

Los tumores con IC presentan con frecuencia alteraciones en forma de ganancias y pérdidas cromosómicas, así como traslocaciones. Las pérdidas alélicas también son relativamente frecuentes, presentando un desequilibrio alélico a nivel de múltiples loci, siendo la aneuploidía la característica de este tipo de tumores. Las causas para que se produzca la IC son heterogéneas habiéndose descrito múltiples genes capaces de originarlas, pero con un factor iniciador común en la mayoría de los casos que es la pérdida de un gen supresor como el gen *APC*. La mayoría del CCR esporádico (aproximadamente el 85%) pertenece a este grupo de tumores (también llamado tumores con EMS) si bien, en muchos pacientes se solapan varias vías de carcinogénesis (Perea J *et al*, 2011). En nuestro estudio, la IC fue mayor en los tumores de colon derecho, no solo a expensas del IIG, sino también en cuanto a la ANC por caso. La localización izquierda presentó un llamativo bajo índice de IC, siendo la localización rectal intermedia entre ambos, salvo en el número de cromosomas completos alterados en el que el recto fue la que presentó mayor número. Cabe destacar el elevado índice de IC en los tumores derechos, lo cual contrasta con lo publicado en otras series, sin distinción en base a la edad, donde la IC no es mayoritaria en la

localización derecha dado el predominio de la IMS (de la Chapelle A, Hampel H, 2010). La ausencia de una región predominantemente alterada en el análisis de arrays de CGH, la cual no alcanza el 50%, habla de la heterogenicidad en este grupo de tumores. Muchas de estas regiones alteradas han sido previamente estudiadas, aunque sin una distinción en base a la edad, como las pérdidas en 5q13 o las alteraciones en 7q21, asociadas a mala respuesta a terapia neoadyuvante en cáncer rectal (Molinari C *et al.*, 2011).

En cuanto a las regiones recurrentemente alteradas (ya sean ganancias o pérdidas) en las diferentes localizaciones, fueron predominantes en la localización derecha, seguida de la rectal. Llama la atención que estas regiones recurrentemente alteradas se encuentran en relación con localizaciones comunes de fragilidad, FRA, las cuales podrían tratarse de puntos de acceso para el desarrollo de la inestabilidad genómica o actuar como unidades funcionales cuya alteración facilite fenómenos de carcinogénesis. La región FRA más frecuentemente alterada en las tres localizaciones se encuentra entre FRA 7B y FRA 20Ad.

Respecto al análisis NGS para las mutaciones somáticas, el grupo de CCRAT fue el único grupo de edad en el que se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en las mutaciones en *KRAS* (58% de los pacientes presentaron mutación en *KRAS* frente al 42% de tumores no mutados), especialmente llamativas ($p=0.005$) en las localizaciones derecha (73%) y rectal (63%). También destacan, aunque no de forma significativa, la presencia de mutaciones en *APC* (50%), *P53* (45%) y *PIK3CA* (19%), mutaciones más frecuentes a nivel global detectadas en el CCR (Tsaousis GN *et al.*, 2019; Furtado LV y Samowitz WS, 2017).

2. Pacientes con CCR jóvenes

Los resultados del análisis del grupo de pacientes con CCRJ se encuentran descritos y publicados en la tesis doctoral “Características diferenciales de las principales vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal de aparición precoz según su localización” (Fernández-Miguel T, 2021) y en el artículo titulado “*Classifying early-onset colorectal cancer according to tumor location: new potential subcategories to explore*”

(Perea J *et al.*, 2015), cuyo resumen se ha mencionado en el apartado de resultados y que se ampliará en el análisis comparativo con el grupo de CCRAT.

3. Análisis comparativo del CCR según la edad de aparición y la localización tumoral.

3.1. Tumores de localización derecha: análisis comparativo entre el CCRJ y el CCRAT

Dentro del grupo de tumores de localización derecha, fue más frecuente el diagnóstico de estos tumores en los pacientes con CCRAT, frente a los jóvenes (39% y 24%, respectivamente). En nuestra serie no existieron diferencias significativas según la distribución por sexo, si bien la mayoría de los diagnósticos de tumores derechos se realizaron en mujeres, en ambos grupos de edad. Las principales diferencias clínicas entre ambos grupos de edad se encontraron fundamentalmente mediadas por el mayor diagnóstico de SL en los pacientes jóvenes, con tumores pobremente diferenciados, diagnosticados en etapas tempranas, con un mayor número de pólipos durante el seguimiento e importante componente familiar de neoplasias relacionadas con SL, todo ello relacionado con el seguimiento estrecho de estos pacientes mediante los programas de *screening*. Los pacientes jóvenes presentaron una mayor SLE y SG en la localización derecha, respecto del grupo de CCRAT (180 meses en el grupo de CCRJ frente a 46 meses en el grupo de CCRAT), similar a lo publicado en otras series. Igualmente, se objetivó una mayor mortalidad en la localización derecha en el grupo de CCRAT respecto a los jóvenes (33.3%). La única localización donde se objetivó mayor número de pólipos en el grupo de pacientes jóvenes fue el colon derecho (70% de los pacientes).

El colon derecho en ambos grupos fue la localización más frecuente de diagnóstico de CCR sincrónico (20% en el grupo de CCRJ y 24.3% en el grupo de CCRAT), siendo significativa esta diferencia respecto al resto de localizaciones únicamente en el grupo de pacientes jóvenes.

Dentro de las características histopatológicas, destaca el elevado componente mucinoso en la localización derecha en ambos grupos de edad respecto al resto de localizaciones (37.5% en el grupo de CCRJ y 34% en el grupo de CCRAT), con mayor prevalencia de tumores pobremente diferenciados en el grupo de jóvenes, en relación con la mayor prevalencia de SL, datos similares a lo descrito en la literatura (Glebov OK *et al.*, 2003).

Con respecto a las alteraciones moleculares, la localización con mayor porcentaje de IMS en ambos grupos fue la localización derecha (30% en el CCRJ y 18.4% en el CCRAT), presentando en todos los casos de CCRJ mutaciones germinales en genes MMR y diagnóstico de SL, similar a lo descrito por Lynch HT *et al.* en 1988, mientras que la mayoría de los pacientes inestables del grupo de CCRAT presentaron mutación en *BRAF*^{V600E} o hipermetilación en su promotor (Dekker E *et al.*, 2019; Baran B *et al.*, 2018).

En cuanto al fenotipo metilador, llama la atención la mayor proporción de fenotipo metilador (CIMP-alto) en el colon derecho en el grupo de pacientes jóvenes respecto al grupo de CCRAT (50% y 19.4%, respectivamente). En cuanto a la clasificación molecular, en el colon derecho es estadísticamente significativo el mayor predominio de tumores de tipo EMS-CIMP-0/bajo en el grupo de CCRAT respecto a los pacientes jóvenes, con mayor proporción de tumores de tipo EMS-CIMP-alto en el grupo de pacientes jóvenes respecto al grupo de CCRAT, características que resultan similares a las descritas por Dekker E *et al.* en 2019, aunque sin tener en cuenta la diferencia según la edad de los pacientes.

En cuanto a la IC, en el colon derecho se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en el IIG para pérdidas y cromosomas normales, siendo el IIG claramente superior en el grupo de CCRAT, con mayor número de cromosomas normales en el grupo de pacientes jóvenes. A pesar de la mayor IC en el grupo de CCRAT, las dos regiones diferenciales más frecuentemente alteradas se objetivaron en el grupo de los jóvenes (1q21 y 10q11.21-11.22). El mayor número de alteraciones en 1q21 ya han sido descritas previamente en pacientes jóvenes, aunque sin el criterio de la localización tumoral (Berg M *et al.*, 2010), mientras que 10q11.21-11.22 es la región donde se localiza el gen *RET* (Ishizaka Y *et al.*, 1989). En el grupo de jóvenes, también merece la pena destacar la elevada presencia de pérdidas en 14q11.1-11.2, región

donde se localiza el gen *NDRG2*, gen supresor tumoral asociado con *c-MYC* y la vía de carcinogénesis colorrectal de TGF- β (Shu X *et al.*, 2015), promoviendo su silenciamiento epigenético la proliferación y la invasividad tumoral (Hong SN *et al.*, 2016).

Respecto al análisis de las mutaciones somáticas mediante NGS se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en *KRAS* en el grupo de CCRAT, con un 73% de mutaciones en el colon derecho, frente al 58% en el CCRJ, siendo la localización con mayor presencia de mutaciones en *KRAS* en ambos grupos de edad.

3.2. Tumores de localización izquierda: análisis comparativo entre el CCRJ y el CCRAT

La mayor proporción de tumores izquierdos fue objetivada en el grupo de los pacientes jóvenes (42.7%), con diferencias en la distribución entre sexos muy similares en ambos grupos de edad, con una mayor proporción de pacientes varones, similar a lo publicado por Dekker E *et al.* en 2019. La mayoría de las características clínico-patológicas y familiares fueron muy similares entre ambos grupos edad, siendo relevante el diagnóstico temprano en los pacientes jóvenes (80% de los mismos diagnosticados en estadios I y II), probablemente debido al seguimiento estrecho de estos pacientes, así como el predominio de tumores con bajo grado de diferenciación en el grupo de CCRAT. En el grupo del CCRAT se objetivó la presencia de un mayor número de pólipos, así como la presencia de otras neoplasias colorrectales (CCR sincrónico y/o metacrónico), hasta en el 36% de los pacientes frente a 0 pacientes en el grupo de los jóvenes. Respecto a las neoplasias relacionadas y no relacionadas con el SL, a pesar de la mayor agregación familiar global en el grupo de CCRJ, la única localización en la que predominaron en el grupo de CCRAT fue el colon izquierdo.

En cuanto a la SLE, aunque no significativa, fue mayor en el grupo de pacientes jóvenes en todas las localizaciones, si bien la única localización en la que la SG fue mayor en el grupo de CCRAT fue en la localización izquierda.

Entre las características moleculares en la localización izquierda, cabe destacar la elevada IC en el grupo de jóvenes, fundamentalmente debido a la elevada ANC, con una escasa diferencia en el número de segmentos cromosómicos alterados en ambos grupos de edad, similar a lo publicado previamente en dicha localización (Dekker E *et al.*, 2019; Baran B *et al.*, 2018; Lee MS, Menter DG y Kopetz S, 2017). En el colon izquierdo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el IIG, aunque la media de cromosomas completos alterados fue claramente superior en el grupo de jóvenes, con diferencias significativas ($p=0.03$) tanto para las ganancias como para las pérdidas. Las pérdidas más frecuentes en el grupo de jóvenes fueron en 1p12-q21.1, 5q13.1-13.2, 9p12-q24.22, 9q31.3-33.1, 11p11.12-q12.1 y 11q14.41-14.3, así como las ganancias en 19p13.12-12.

Las pérdidas en 1q21.1-21.2 han sido descritas frecuentemente en el CCRJ (Berg M *et al.*, 2010); las pérdidas en 11q14.1-14.3 se han asociado con comportamientos tumorales agresivos y mayor agregación familiar, así como relación con tumores prostáticos (Schaid DJ *et al.*, 2007); las ganancias en 19p13.12 pueden relacionarse con la expresión de *NOTCH3* (Blaumueller CM *et al.*, 1997); además, 11q14.1 es un enlace para *GAB2*, gen involucrado en la transición epitelio-mesenquimal y en el desarrollo de invasión linfática y metástasis (Ding C *et al.*, 2016).

Entre los pacientes con IMS, dentro del grupo joven, en la localización izquierda de los 6 casos confirmados con IMS únicamente 4 presentaron mutación en genes MMR y diagnóstico de SL. Respecto al estado mutacional de *BRAF*^{V600E}, únicamente un paciente en el grupo de jóvenes presentó mutación en el gen y fue localizado en el colon izquierdo.

Dentro del fenotipo metilador, el estado de metilación es mayor en el grupo de CCRAT en la localización izquierda con respecto al grupo de los jóvenes, aunque con diferencias no significativas. En cuanto a la clasificación molecular, en el colon izquierdo fueron claramente predominantes en ambos grupos de edad los tumores con EMS y bajo perfil de metilación (77.5% en el grupo de CCRJ y 85.7% en el grupo de CCRAT).

Respecto a la mutación en *KRAS* objetivada en el análisis mediante NGS, el colon izquierdo es la localización con menor presencia de mutaciones a nivel global

(28% en el grupo de CCRAT y 26% en el grupo de CCRJ), siendo significativo en el grupo de CCRAT frente al resto de localizaciones (73% en el colon derecho y 63% en el recto).

3.3. Tumores de localización rectal: análisis comparativo entre el CCRJ y el CCRAT

Los tumores de localización rectal fueron más frecuentemente diagnosticados en el grupo de CCRAT, con predominio de sexo masculino, muy similar en ambos grupos de edad. Similar a la localización derecha, la SLE y la SG fueron claramente superiores en los pacientes jóvenes con respecto al CCRAT, siendo estadísticamente significativa. La mortalidad global, relacionada y no relacionada con cáncer, fue mayor en la localización rectal para ambos grupos de edad.

Especialmente llamativa fue la diferencia en el número de pólipos asociados la localización rectal, con predominio en el grupo de CCRAT (41% en el grupo del CCRJ frente al 67.6% en el grupo de CCRAT).

Desde el punto de vista familiar, las neoplasias relacionadas con SL fueron superiores en el grupo de CCRJ, como ya se ha comentado, en todas las localizaciones, y especialmente relevantes en la localización rectal (con más del 50% de los casos con antecedentes familiares de neoplasias relacionadas con SL, frente a 0 pacientes en el grupo de CCRAT). En relación con la mayor proporción de neoplasias relacionadas con SL en la localización rectal, se objetivó diferencia significativa en el carácter esporádico del grupo de CCRAT.

A pesar de la mayor SLE y SG en los pacientes jóvenes, los tumores rectales diagnosticados en estadios avanzados (estadio IV) fueron superiores en este grupo de edad (37% con metástasis al diagnóstico), con predominio de estadios precoces en el grupo de CCRAT, especialmente en el estadio II, con un 50% de los pacientes en el grupo de CCRAT frente a un 7% de los pacientes en el grupo de jóvenes. El elevado componente mucinoso en los pacientes del grupo de CCRAT, a pesar de la baja

presencia de tumores pobremente diferenciados y estadios más precoces, podría encontrarse en relación con los peores resultados en este grupo en cuanto a SG y SLE.

A nivel molecular, destaca la ausencia de IMS en esta localización para ambos grupos de edad, siendo llamativa la elevada presencia de neoplasias relacionadas con SL en el grupo de pacientes jóvenes a pesar de que todos ellos fueron estables. El estado de metilación fue mayor en el grupo de CCRAT, siendo hasta el 36% de los tumores de tipo EMS-CIMP-alto. Más del 90% de los pacientes jóvenes presentaron tumores de tipo EMS-CIMP-0/bajo. Respecto a la IC, en el recto se evidenciaron mayores ganancias y cromosomas normales en el grupo de pacientes jóvenes, aunque sin diferencias estadísticamente significativas en esta localización. Las ANC fueron algo mayores en el grupo de CCRAT, con una media de cromosomas completos alterados algo mayor, con cifras similares de ganancias y pérdidas. Resultaron predominantes las pérdidas en 1p36.32-36.13 y las ganancias en 5q13.2, en el grupo de CCRAT. Las ganancias en 5q13.2 involucran un segmento cromosómico relacionado con tumores rectales metastásicos (Zhou HT *et al.* 2013).

Respecto al análisis mediante NGS, como se ha comentado previamente, únicamente destaca la elevada presencia de mutaciones en *KRAS* en el grupo de CCRAT frente a los pacientes no mutados ($p=0.007$), siendo la localización rectal la más frecuente después del colon derecho (63% de los pacientes) y con diferencias significativas respecto al grupo de jóvenes (33% de mutaciones en el grupo de CCRJ, frente al 63% en el grupo de CCRAT).

Finalmente, desde el punto de vista de la clasificación de consenso molecular para el CCR (Guinney J *et al.*, 2015), podemos describir nuestros resultados según el grupo de edad y la localización tumoral:

- Subtipo 1 de consenso molecular (SCM1 o IMS de tipo inmune): subtipo fundamentalmente localizado en el colon derecho, caracterizado por presencia de IMS en ambos grupos de edad, pero con clara prevalencia en los tumores de colon derecho de los pacientes jóvenes. Los tumores de colon derecho del CCRJ fueron predominantemente CIMP-alto, con baja presencia de ANC somáticas o IC. Los tumores de colon derecho en el grupo de CCRAT presentaron mutaciones en *BRAF*, alto grado de diferenciación, predominio de sexo femenino y peor supervivencia global tras recidiva, de acuerdo con

estudios que muestran peor pronóstico de los pacientes con IMS y presencia de mutación en *BRAF* en la recaída tumoral (Tran B *et al.*, 2011). En nuestro estudio, el mejor pronóstico global se objetivó en los tumores de colon derecho del grupo de pacientes jóvenes, mientras que el mejor pronóstico en el grupo de CCRAT fue en la localización izquierda.

- Subtipo 2 de consenso molecular (SCM2): es el subtipo más frecuente y se define por una ANC somáticas muy superior a otros subtipos, de localización predominantemente izquierda y con una elevada SG. Características compartidas con los resultados obtenidos en nuestro estudio en los pacientes con CCRJ, salvo en referencia a la mayor SG que se objetivó en los pacientes del grupo de CCRAT en su localización izquierda.
- Subtipo 3 de consenso molecular (SCM3 o metabólico): este subtipo se caracteriza por presencia de IMS, CIMP-bajo y baja ANC. Algunas características de este subtipo se pueden aplicar a nuestros pacientes, tanto dentro del grupo joven (predominio de localización izquierda, CIMP-bajo e IMS, así como predominio de CIMP-bajo también en la localización rectal), como dentro del grupo de CCRAT (baja ANC y CIMP-alto).
- Subtipo 4 de consenso molecular (SCM4 o mesenquimal): presenta elevada ANC, predominio de tumores diagnosticados en estadios avanzados y peor SLE y SG. Los tumores rectales, especialmente en el grupo de jóvenes, pueden ser clasificados en este subgrupo molecular. Cabe destacar, que esta clasificación molecular se centra fundamentalmente en las localizaciones derechas e izquierdas, con escasa presencia de tumores rectales incluidos. Los tumores rectales en el grupo de CCRJ presentan características especiales y su estudio se encuentra en auge, incluidos los tumores de este subtipo molecular (Patel SG *et al.*, 2018). Estos tumores presentan el peor pronóstico global respecto a todas las localizaciones y grupos de edad, siendo considerado en muchos estudios el cáncer de recto en pacientes jóvenes como una entidad aparte con respecto al resto de CCR (Tamas K *et al.*, 2015). Es necesario el estudio de un mayor número de pacientes con estas características, a fin de incluir este subgrupo especial de pacientes en una categoría diferente respecto del resto del CCR.

Nuestros resultados, así como su correlación relativa con esta clasificación molecular, debe ser considerada con cautela, debido al pequeño tamaño de nuestra

muestra. Es necesaria la realización de estudios con la inclusión de un mayor número de pacientes, así como una sucesiva cohorte de validación, para confirmar nuestros resultados actuales, si bien es evidente no solo avalado por la extensa literatura actual, sino por los resultados obtenidos en el presente estudio, que el CCR es una entidad heterogénea, en la que intervienen múltiples factores no solo epidemiológicos, sino a nivel genético y molecular, por lo que es necesario considerar cada localización tumoral y cada subgrupo de edad como una entidad diferente, con características específicas al diagnóstico y resultados a tratamiento, pronóstico e intervalos de supervivencia únicos para cada grupo de pacientes.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. En nuestra serie, el CCRAT presentó distribución similar entre sexos, siendo menos frecuente la localización izquierda, con importante asociación de pólipos. Los tumores fueron de predominio esporádico, con escasos antecedentes familiares. Destacó la baja presencia de tumores pobremente diferenciados, con predominio de componente mucinoso.
2. A nivel molecular, el CCRAT presentó escasa IMS (fundamentalmente asociada a mutaciones en *BRAF*^{V600E}), con baja presencia de fenotipo metilador, siendo los casos con CIMP-alto aquellos con IMS de tipo esporádico. La mayoría de los pacientes fueron EMS-CIMP-bajo. El 35% de los pacientes no presentó ninguna alteración en cromosomas enteros, destacando una ANC por caso menor del 50%.
3. En el análisis por localizaciones dentro del CCRAT, los pacientes más jóvenes se localizaron en el colon izquierdo, siendo la localización con mayor agregación familiar. Predominaron los tumores de colon derecho en mujeres, con mayor porcentaje de tumores pobremente diferenciados y componente mucinoso. La peor SG se objetivó en las localizaciones derecha y rectal.
4. En el mismo grupo, desde el punto de vista molecular, el mayor porcentaje de IMS se objetivó en el colon derecho, siendo todos los tumores rectales estables. El recto presentó el mayor estado de metilación, con un 36% de los tumores de tipo CIMP-alto, aunque en todas las localizaciones predominó la EMS-CIMP-bajo. La IC fue mayor en los tumores de colon derecho, no solo a expensas del IIG, sino también en cuanto a la ANC por caso, con bajo índice de IC en los tumores izquierdos.

5. En el análisis comparativo según la edad y la localización tumoral, los tumores de colon derecho fueron predominantes en mujeres a nivel global, con mayor SG y SLE en el CCRJ, a pesar del bajo grado de diferenciación y componente mucinoso. El 30% del CCRJ presentó IMS, con la mayor proporción de pacientes con SL. El 18% del CCRAT presentó IMS (localización más inestable de este grupo), fundamentalmente asociada a mutaciones en *BRAF*^{V600E}. Se evidenció predominio de CIMP-alto en el CCRJ, siendo la mayoría del CCRAT de tipo EMS-CIMP-0/bajo. La mayoría de las regiones cromosómicas recurrentemente alteradas se evidenciaron en el CCRAT, con mayor IIG y media de cromosomas completos alterados.
6. El colon izquierdo fue la localización más prevalente en el CCRJ, con características clínicas y familiares transicionales entre el colon derecho y el recto. En el CCRAT se objetivó mayor presencia de pólipos asociados, así como neoplasias sincrónicas y/o metacrónicas. A nivel global predominó la EMS-CIMP-0/bajo, con un 17% de IMS y SL en el CCRJ. La ANC por caso y la media de cromosomas completos alterados fueron superiores en el CCRJ, sin diferencias en el IIG.
7. El recto presentó la peor SG y SLE a nivel global, especialmente en el CCRAT, a pesar de que el CCRJ presentó al diagnóstico estadios más avanzados, con un 67% de pólipos asociados en el CCRAT. Todos los pacientes presentaron EMS, aunque con un 52% de agregación familiar en el CCRJ. El 36% del CCRAT presentó CIMP-alto, predominando los tumores EMS-CIMP-0/bajo a nivel global, con escasa IC en ambos grupos.
8. En el análisis mediante NGS para el estudio de mutaciones somáticas únicamente fue significativa la elevada presencia de mutaciones en *KRAS* (58% de los pacientes) en el grupo de CCRAT, con diferencias significativas en la localización derecha y rectal, respecto al colon izquierdo en este grupo.
9. Los hallazgos de nuestro estudio sugieren que el CCR es una entidad heterogénea, con características diferenciales desde el punto de vista clínico,

familiar, anatomopatológico y molecular, con importantes diferencias según la edad de diagnóstico y la localización tumoral. El presente estudio destaca las diferencias en las bases moleculares del CCR según la edad y la localización en el colon, siendo el conocimiento de las características específicas de cada grupo fundamental para un futuro manejo terapéutico de esta patología.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E *et al* (1999): "Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes", *Int J Cancer*, 81, pp. 214-218.
2. Advani SM, Advani P, DeSantis SM *et al* (2018): "Clinical, pathological, and molecular characteristics of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: a systematic review and metaanalysis", *Transl Oncol*, 11, pp. 1188-1201.
3. Aherne ST, Madden SF, Hughes DJ *et al* (2015): "Circulating miRNAs miR-34a and miR-150 associated with colorectal cancer progression", *BMC Cancer*, 15:329.
4. Ahmed Farag AF, Elbarmelgi MY *et al* (2016): "TNMF versus TNM in staging of colorectal cancer", *Int J Surg*, 27, pp. 147-150.
5. Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M *et al* (2014): "Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study", *BMC Med*, 12, pp. 168.
6. Algra AM y Rothwell PM (2012): "Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials", *Lancet Oncol*, 13(5), pp. 518-27.
7. Aljehani MA, Morgan JW, Guthrie LA *et al* (2018): "Association of Primary Tumor Site With Mortality in Patients Receiving Bevacizumab and Cetuximab for Metastatic Colorectal Cancer", *JAMA Surg*, 153(1), pp. 60-67
8. Álvaro E, Cano JM, García JL *et al* (2019): "Clinical and Molecular Comparative Study of Colorectal Cancer Based on Age-of-Onset and Tumor Location: Two Main Criteria for Subclassifying Colorectal Cancer", *Int. J. Mol. Sci*, 20, pp. 968.
9. Amin MB, Greene FL, Edge SB *et al* (2017): "The eighth edition AJCC Cancer Staging Manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging", *CA Cancer J Clin*, 67, pp. 93-99.
10. Andre T, Boni C, Mounedj-Boudiaf L *et al* (2004): "Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer", *N Engl J Med*, 350, pp. 2343-51.
11. André T, Shiu KK, Kim TW *et al* (2020): "Pembrolizumab in microsatellite- instability-high advanced colorectal cancer". *N Engl J Med* 383: 2207–18.
12. Antelo M, Balaguer F, Shia J *et al* (2012): "A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer", *PLoS One*, 7, e45357.
13. Archambault AN, Su YR, Jeon J *et al* (2020): "Cumulative burden of colorectal cancer- associated genetic variants is more strongly associated with early-onset vs late- onset cancer". *Gastroenterology* 158(5):1274–86. e12.
14. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M *et al* (2017): "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality", *Gut*, 66, pp. 683–91.
15. Arriba M, García JL, Inglada-Pérez L *et al* (2016): "DNA copy number profiling reveals different patterns of chromosomal instability within colorectal cancer according to the age of onset", *Mol Carcinog*, 55, pp. 705-16.
16. Ashktorab H, Kupfer SS, Brim H *et al* (2017): "Racial Disparity in Gastrointestinal Cancer Risk". *Gastroenterology*, 153, pp. 910-923.
17. Aydin O, Nieuwdorp M y Gerdes V (2018): "The gut microbiome as a target for the treatment of Type 2 Diabetes", *Curr Diab Rep*, 18(8), pp. 55.
18. Ayez N, Lalmahomed ZS, Eggermont AM *et al* (2012): "Outcome of microscopic incomplete resection (R1) of colorectal liver metastases in the era of neoadjuvant chemotherapy", *Ann Surg Oncol*, 19(5), pp. 1618-27.
19. Bailey CE, Hu CY, You YN *et al* (2015): "Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010", *JAMA Surg*, 150, pp. 17-22.
20. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM *et al* (1990): "p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis", *Cancer Res*, 50, pp. 7717-7722.
21. Ballester V, Rashtak S y Boardman L (2016): "Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer", *World J Gastroenterol*, 22(5), pp. 1736-1744.
22. Baran B, Ozupek NM, Tetik NY *et al* (2018): "Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature", *Gastroenterology Res*, 11(4), pp. 264-273.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

23. Bardou M, Barkun A y Martel M (2010): "Effect of statin therapy on colorectal cancer", *Gut*, 59, pp. 1572-85.
24. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM *et al* (2018): "NCCN guidelines insights: colon cancer, Version 2.2018", *J Natl Compr Canc Netw*, 16(4), pp. 359-369.
25. Benvenuti S, Frattini M, Arena S *et al* (2008): "PIK3CA cancer mutations display gender and tissue specificity patterns", *Hum Mutat*, 29, pp. 284-288.
26. Berg M, Agesen T.H, Thiis-Evensen E *et al* (2010): "Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci", *Mol Cancer* 9, 100.
27. Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E *et al* (2010): "Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci". *Mol Cancer* 6; 9:100.
28. Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E *et al* (2010): "Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci". *Mol. Cancer* 9, 100.
29. Berger NA, Savvides P, Koroukian SM *et al* (2006): "Cancer in the elderly", *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 117:147-55.
30. Bessa X, Balleste B, Andreu M *et al* (2008): "A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening", *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6, pp. 206-214.
31. Bettington M, Walker N, Clouston A *et al* (2013): "The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges", *Histopathology*, 62(3), pp. 367-86.
32. Bird AP (1986): "CpG-rich islands and the function of DNA methylation", *Nature*, 321(6067), pp. 209-213.
33. Blaker H, Alwers E, Arnold A *et al* (2019): "The association between mutations in BRAF and colorectal cancer-specific survival depends on microsatellite status and tumor stage", *Clin Gastroenterol Hepatol*, 17, pp. 455-462.
34. Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P *et al* (1997): "Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane". *Cell* 90, 281-291.
35. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR *et al* (1998): "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer", *Cancer Res*, 58, pp. 5248-5257.
36. Boland PM y Ma WW (2017): "Immunotherapy for colorectal cancer", *Cancers (Basel)*, 12(5), pp. 1320.
37. Bonjer HJ (2015): "A Randomized Trial of Laparoscopic versus Open Surgery for Rectal Cancer", *N Engl J Med*, 372, pp. 1324-1332.
38. Bosman GT, Carneiro F, Hruban RH *et al* (2010) *WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Fourth Edition*. France: IARC.
39. Brandariz L, Alegre C, Rueda E *et al* (2016): "New Perspectives in Multiple Primary Colorectal Cancer: A Surgical Approach", *Digestion* 4:57-65.
40. Brandariz L, Arriba M, García JL *et al* (2018): "Differential clinicopathological and molecular features within late-onset colorectal cancer according to tumor location", *Oncotarget*, 9 (20), pp. 15302-15311.
41. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I *et al* (2018): "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA Cancer J Clin*, 68, pp. 394-424.
42. Burgess NG, Tuticci NJ, Pellise M *et al* (2014): "Sessile serrated adenomas/polyps with cytologic dysplasia: a triple threat for interval cancer", *Gastrointest Endosc*, 80, pp. 307-310.
43. Burnett-Hartman AN, Powers JD *et al* (2019): "Treatment patterns and survival differ between early-onset and late-onset colorectal cancer patients: the patient outcomes to advance learning network", *Can Caus & Contr*, 30:747-755.
44. Campos FG, Figueiredo MN y Martinez CA (2015): "Colorectal cancer risk in hamartomatous polyposis syndromes", *World J Gastrointest Surg*, 7, pp. 25-32.
45. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J *et al* (2022): "PD-1 blockade in mismatch repair-deficient, locally advanced rectal cancer". *N Engl J Med* 386(25):2363-76.
46. Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK *et al* (2020): "Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers". *Nat Med* 26(4):566-76.
47. Chan AO-O, Issa J-P, Morris JS *et al* (2002): "Concordant CpG island methylation in hyperplastic polyposis", *Am J Pathol*, 160, pp. 529-536.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

48. Chang DT, Pai RK, Rybicki LA *et al* (2012): "Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features", *Mod Pathol*, 25, pp. 1128-39.
49. Chau I, Allen MJ, Cunningham D *et al* (2004): "The value of routine serum carcinoembryonic antigen measurement and computed tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer", *J Clin Oncol*, 22, pp. 1420-29.
50. Chen HM y Fang JY (2009): "Genetics of the hamartomatous polyposis syndromes: a molecular review", *Int J Colorectal Dis*, 24, pp. 865-874.
51. Chiu HM, Chen SL, Yen AM *et al* (2015): "Effectiveness of fecal immunochemical testing in reducing colorectal cancer mortality from the One Million Taiwanese Screening Program", *Cancer*, 121, pp. 3221-29.
52. Church J y Simmang C (2003): "Practice parameters for the treatment of patients with dominantly inherited colorectal cancer (familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer)", *Dis Colon Rectum*, 46, pp. 1001-12.
53. Claessen MM, Lutgens MW, van Buuren HR *et al* (2009): "More right-sided IBD- associated colorectal cancer in patients with primary sclerosing cholangitis", *Inflamm Bowel Dis*, 15, pp. 1331-6.
54. Colon Cancer Laparoscopic or Open Resection Study Group. (2009): "Survival after laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: long-term outcome of a randomised clinical trial", *Lancet Oncol*, 10, pp. 44-52.
55. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F *et al* (2013): "Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention", *Int J Mol Sci*, 14(8), pp. 16365-85.
56. Connell WR, Lennard-Jones JE, Williams CB *et al* (1994): "Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis", *Gastroenterology*, 107, pp. 934-44.
57. Consensus statement on the multidisciplinary management of patients with recurrent and primary rectal cancer beyond total mesorectal excision planes (2013), *Br J Surg*, 100, pp. E1-33.
58. Consortium TGO, Ashburner M, Ball CA, Blake JA *et al* (2000): "Gene Ontology: tool for the unification of biology David", *Nat. Genet.* 25, 25-29.
59. Cooper GS, Kou TD y Rex DK (2013): "Complications following colonoscopy with anesthesia assistance: a population-based analysis", *JAMA Intern Med*, 173(7), pp. 551-6.
60. Cooper HS, Deppisch LM, Gourley WK *et al* (1995): "Endoscopically removed malignant colorectal polyps: clinicopathologic correlations", *Gastroenterology*, 108, 1657-65.
61. Corso G, Pascale V, Flauti G *et al* (2013): "Oncogenic mutations and microsatellite instability phenotype specific anatomical subsite in colorectal cancer", *Eur J Hum Genet* 21:1383-88.
62. Council of the European Union (2003): "Council Recommendation of 2 December 2003 on Cancer Screening (2003/878/EC) 878", *Off J Eur Union*.
63. Cyhaniuk A y Coombes ME (2016): "Longitudinal adherence to colorectal cancer screening guidelines", *Am J Manag Care*, 22 (2), pp. 105-111.
64. Daca Alvarez M, Quintana I, Terradas M *et al* (2021): "The inherited and familial componente of early-onset colorectal cancer". *Cells* 10(3): 710.
65. Dahm CC, Keogh RH, Spencer EA *et al* (2010): "Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case-control study using food diaries", *J Natl Cancer Inst*, 102(9), pp. 614-26.
66. Datta RV, LaQuaglia MP y Paty PB (2000): "Genetic and phenotypic correlates of colorectal cancer in young patients", *N Eng J Med*, 342 (2), pp.137-138.
67. Davies H, Bignell GR, Cox C *et al* (2002): "Mutations of the BRAF gene in human cancer", *Nature*, 417(6892), pp. 949-954.
68. De Graaf EJR, Doornebosch PG, Tollenaar RAE *et al* (2009): "Transanal endoscopic microsurgery versus total mesorectal excision of T1 rectal adenocarcinomas with curative intention", *Eur J Surg Oncol*, 35, pp. 1280-5.
69. De la Chapelle A, Hampel H (2010): "Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer", *J Clin Oncol* 8:3380-87.
70. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T *et al* (1997): "Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression", *Cancer Res*, 57, pp. 4749-4756.
71. Ding C, Luo J, Li L *et al* (2016): "Gab2 facilitates epithelial-to-mesenchymal transition via the MEK/ERK/MMP signaling in colorectal cancer". *J Exp Clin Cancer Res* 35, 5.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

72. Doornebosch PG, Zeestraten E y de Graaf EJ (2011): "Transanal endoscopic microsurgery for T1 rectal cancer: size matters", *Surg Endosc*, 26, 551-557.
73. Douillard JY, Oliner KS, Siena S *et al* (2013): "Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer", *N Engl J Med*, 369(11), pp. 1023-34.
74. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C *et al* (2003): "Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on tumour markers (EGTM) guidelines", *Eur J Cancer*, 39(6), pp. 718-27.
75. Dukes CE (1932): "The classification of cancer of the rectum", *J. Pathol. Bacteriol*, 35, pp. 323e332.
76. Duval A y Hamelin R (2002): "Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability", *Cancer Res*, 62, pp. 2447-2454.
77. Eaden JA, Abrams KR y Mayberry JF (2001): "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis", *Gut*, 48, pp. 526-35.
78. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A *et al* (1994): "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas", *Gastroenterology*, 107, pp. 1183-1188.
79. Evrard S, Poston G, Kissmeyer-Nielsen P *et al* (2014): "Combined ablation and resection (CARE) as an effective parenchymal sparing treatment for extensive colorectal liver metastases", *PLoS One*, 9(12), pp. e114404.
80. Falcone A, Ricci S, Brunetti I *et al* (2007): "Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest", *J Clin Oncol*, 25(13), pp. 1670-6.
81. Farrington SM, Lin-Goerke J, Ling J *et al* (1998): "Systematic analysis of hMSH2 and hMLH1 in young colon cancer patients and controls", *Am J Hum Genet*, 63, pp. 749-59.
82. Fearon ER y Vogelstein B (1990): "A genetic model for colorectal tumorigenesis", *Cell*, 61, pp. 759-767.
83. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V *et al* (2011): "Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies", *Ann Oncol*, 22(9), pp. 1958-1972.
84. Fernández-Miguel T (2021): "Características diferenciales de las principales vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal de aparición precoz según su localización", tesis doctoral *cum laude*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
85. Floriani I, Torri V, Rulli E *et al* (2010): "Performance of imaging modalities in diagnosis of liver metastases from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis", *J Magn Reson Imaging*, 31(1), pp. 19-31.
86. Folkesson J, Birgisson H, Pahlman L *et al* (2005): "Swedish rectal cancer trial: Long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate", *J Clin Oncol*, 23, pp. 5644-5650.
87. Furtado LV, Samowitz WS (2017): "Colorectal cancer molecular profiling: from IHC to NGS in search of optimal algorithm". *Virchows Arch*, 471 (2): 235-242.
88. Ganapathi S, Kumar D, Katsoulas N *et al* (2011): "Colorectal cancer in the young: trends, characteristics and outcomes", *Int J Col Dis*, 26 (7), pp. 927-934.
89. Gao R, Gao Z, Huang L *et al* (2017): "Gut microbiota and colorectal cancer", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 36(5), pp. 757-769.
90. Gao Z, Guo B, Gao R *et al* (2015): "Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer", *Front. Microbiol*, 6, pp. 20.
91. García M, Martínez-Villacampa M, Santos C *et al* (2015): "Phase II study of preoperative bevacizumab, capecitabine and radiotherapy for resectable locally advanced rectal cancer", *BMC Cancer*, 15, pp. 59.
92. Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X *et al* (2014): "RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers", *Nat Genet*, 46, pp. 1264-1266.
93. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE *et al* (2014): "Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer", *Am J Gastroenterol*, 109, pp. 1159-1179.
94. Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR *et al* (1987): "Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome", *N Engl J Med*, 316, pp. 1511-1514.
95. Gill S, Loprinzi CL, Sargent D *et al* (2004): "Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?", *J Clin Oncol*, 22, pp. 1797-806.
96. Giorgi Rossi P, Vicentini M, Sacchetti C *et al* (2015): "Impact of screening program on incidence of colorectal cancer: a cohort study in Italy", *Am J Gastroenterol*, 110, pp. 1359-66.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

97. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K *et al* (2003): "Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12(8), pp. 755-62.
98. GLOBOCAN. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr> [última consulta 19/11/2020].
99. Goel A, Nagasaka T, Spiegel J *et al* (2010): "Low frequency of Lynch syndrome among young patients with non-familial colorectal cancer", *Clin Gastroenterol Hepatol*, 8:966-971.
100. Goldstein NS (2006): "Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification", *Am J Clin Pathol*, 125(1), pp. 146-53.
101. Grady WM y Carethers JM (2008): "Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis", *Gastroenterology*, 135, pp. 1079-1099.
102. Greene FL, Stewart AK y Norton HJ (2004): "New tumor-node-metastasis staging strategy for node-positive (stage III) rectal cancer: an analysis", *J Clin Oncol*, 22, pp. 1778-84.
103. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET *et al* (2000): "Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer", *N Engl J Med*, 342, pp. 69-77.
104. Gualco G, Reissenweber N, Cliche I *et al* (2006): "Flat elevated lesions of the colon and rectum: a spectrum of neoplastic and nonneoplastic entities", *Ann Diagn Pathol*, 10(6), pp. 333-338.
105. Guinney J, Dienstmann R, Wang X *et al* (2015): "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer", *Nat Med*, 21, pp. 1350-1356.
106. Guinney J, Dienstmann R, Wang X *et al* (2015): "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer". *Nat Med* 21, 1350-1356.
107. Guldberg P y Guttler F (1993): "A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis", *Nucleic Acids Res*, 21, pp. 2261-2262.
108. Gunderson LL, Sargent D, Tepper JE *et al* (2004): "Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis", *J Clin Oncol*, 22, 1785-96.
109. Gupta S (2022): "Sreening for colorectal cancer". *Hematol Oncol Clin North Am* 36(3): 393-414.
110. Guraya SY (2015): "Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review", *World J Gastroenterol*, 21(19), pp. 6026-31.
111. Haboubi N (2008): "The TNM System, Evaluation and Assessment", *Col Dis* 10(3), pp. 207-208.
112. Habr-Gama A, Perez RO, São Julião GP *et al* (2011): "Nonoperative approaches to rectal cancer: a critical evaluation", *Semin Radiat Oncol*, 21, pp. 234-9.
113. Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE *et al* (1985): "Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy", *Gastroenterology*, 89, 328-36.
114. Hampel H, Frankel WL, Martin E *et al* (2005): "Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)", *N Engl J Med*, 352, pp. 1851-1860.
115. Hampel H, Frankel WL, Martin E *et al* (2008): "Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer", *J Clin Oncol*, 26, pp. 5783-5788.
116. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH *et al* (1996): "Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer", *Lancet*, 348(9040), pp. 1472-7.
117. He TC, Sparks AB, Rago C *et al* (1998): "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway", *Science*, 281(5382), pp. 1509-1512.
118. He WL, Weng XT, Wang JL *et al* (2018): "Association between c-Myc and colorectal cancer prognosis: a meta-analysis", *Front Physiol*, 9, pp. 1549.
119. Heald RJ, Husband EM y Ryall RD (1982): "The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence?", *Br J Surg*, 69, pp. 613-6.
120. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T *et al* (2014): "FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial", *Lancet Oncol*, 15(10), pp. 1065-75.
121. Herman JG, Umar A, Polyak K *et al* (1998): "Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma", *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 6870-6875.
122. Hernandez- Luna MA, Lopez- Briones S y Luria-Perez R (2019): "The four horsemen in colon cancer", *J. Oncol*, 5636272.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

123. Higuchi T, Sugihara K y Jass JR (2005): "Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum", *Histopathology*, 47, pp. 32-40.
124. Holme Ø, Bretthauer M, Fretheim A *et al* (2013): "Flexible sigmoidoscopy versus faecal occult blood testing for colorectal cancer screening in asymptomatic individuals", *Cochrane Database Syst Rev*, 9:CD009259.
125. Holowatyj AN, Gigic B, Herpel E *et al* (2020): "Distinct molecular phenotype of sporadic colorectal cancers among young patients based on multiomics analysis". *Gastroenterology* 158(4):1155–8.
126. Hong SN, Kim SJ, Kim ER *et al* (2016): "Epigenetic silencing of NDRG2 promotes colorectal cancer proliferation and invasion". *J Gastroenterol Hepatol* 31, 164–171.
127. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W *et al* (2004): "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer", *N Engl J Med*, 350(23), pp. 2335–42.
128. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V *et al* (2015): "Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations", *N Engl J Med*, 373, pp. 726-736.
129. Iacopetta B (2002): "Are there two sides to colorectal cancer?", *Int J Cancer*, 101(5), pp. 403-8.
130. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) Investigators (1995): "Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer", *Lancet*, 345, pp. 939-44.
131. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T *et al* (1989): "Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2", *Oncogene* 4, 1519–1521.
132. Japanese Society for cancer of colon and rectum (JSCCR) (1997): *Japanese classification of colorectal carcinoma*. 1ª edición, Tokyo, Kanehara & Co. LTD.
133. Jass JR, Young J, Leggett B (2000): "Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum", *Histopathology* 37:295-301.
134. Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT *et al* (2012): "Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years", *Gastroenterol*, 143(2), pp. 375-81e1.
135. Johnson FE y Virgo KS (2004): "Follow-up for patients with colorectal cancer after curative-intent primary treatment", *J Clin Oncol*, 22, pp. 1363-65.
136. Jones S, Chen WD, Parmigiani G *et al* (2008): "Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution", *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(11), pp. 4283-8.
137. Jover R y Payá A (2003): "Microsatellite instability in colorectal cancer: concept, detection methods and clinical utility", *Gastroenterol Hepatol*, 26(10), pp. 656-63.
138. Jung YS, Park CH, Kim NH *et al* (2017): "Colorectal cancer screening with the fecal immunochemical test in persons aged 30 to 49 years: focusing on the age for commencing screening", *Gastrointest Endosc*, 86, pp. 892-899.
139. Juul T, Ahlberg M, Biondo S *et al* (2014): "Low Anterior Resection Syndrome and Quality of Life", *Dis Colon Rectum*, 57, pp. 585-591.
140. Kahi CJ y Rex DK (2004): "Current and future trends in colorectal cancer screening", *Cancer Met Rev*, 23, pp. 137-44.
141. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL *et al* (2004): "BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum", *Gut*, 53, pp. 1137-1144.
142. Kanehisa M and Goto S (2000): "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes", *Nucleic Acids Res.* 28, 27-30.
143. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID *et al* (2001): "Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer", *N Engl J Med*, 345, pp. 638-46.
144. Kasi PM, Shahjehan F, Cochuyt JJ *et al* (2019): "Rising proportion of young individuals with rectal and colon cancer", *Clin Colorectal Cancer*, 18, pp. 87–95.
145. Kekelidze M, D'Errico L, Pansini M *et al* (2013): "Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation", *World J Gastroenterol*, 19(46), pp. 8502-14.
146. Kikuchi R, Takano M, Takagi K *et al* (1995): "Management of early invasive colorectal cancer. Risk of recurrence and clinical guidelines", *Dis Colon Rectum*, 38, pp. 1286-95.
147. Kim NH, Park JH, Park DI *et al* (2017): "The fecal immunochemical test has high accuracy for detecting advanced colorectal neoplasia before age 50", *Dig Liver Dis*, 49, pp. 557-561.
148. Kirzin S, Marisa L, Guimbaud R *et al* (2014): "Sporadic early-onset colorectal cancer is a specific subtype of cancer: a morphological, molecular and genetics study", *PLoS One*, 9, e103159.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

149. Knudsen AL, Bisgaard ML y Bülow S (2003): "Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature", *Fam Cancer*, 2, pp. 43.
150. Koyama Y y Kotake K (1997): "Overview of colorectal cancer in Japan: report from the Registry of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum", *Dis Colon Rectum*, 40 (Supl. 10), pp. S2-9.
151. Kronborg O, Fenger C, Olsen J *et al* (1996): "Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test", *Lancet*, 348(9040), 1467-71.
152. Kubicka S, Greil R, André T *et al* (2013): "Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings", *Ann Oncol*, 24(9), pp. 2342-9.
153. Kudo S, Kashida H, Nakajima T *et al* (1997): "Endoscopic diagnosis and treatment of early colorectal cancer", *World J Surg*, 21, 694-701.
154. Kuipers EJ (2014): "Colorectal cancer: screening-one small step for mankind, one giant leap for man", *Nat Rev Clin Oncol*, 11(1), pp. 5-6.
155. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D *et al* (2015): "Colorectal cancer", *Nat Rev Dis Primers* 1, pp. 15065.
156. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD *et al* (2013): "Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up", *Ann Oncol*, 24 Suppl 6, pp. vi64-72.
157. Laghi L, Bianchi P, Roncalli M *et al* (2004): "Re: Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability", *J Natl Cancer Inst*, 96(18), pp. 1402-3.
158. Lassen K, Soop M, Nygren J *et al* (2009): "Consensus review of optimal perioperative care in colorectal surgery: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) Group recommendations", *Arch Surg*, 144(10), pp. 961-9.
159. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR *et al* (1989): "Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic", *J Clin Oncol*, 7, pp. 1447-56.
160. Lee JK, Liles EG, Bent S *et al* (2014): "Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis", *Ann Intern Med*, 160(3), pp. 171.
161. Lee MS, Menter DG y Kopetz S (2017): "Right versus left colon cancer biology: integrating the consensus molecular subtypes", *J Natl Compr Canc Netw*, 15, pp. 411-19.
162. Lefevre JH, Mineur L, Kotti S *et al* (2016): "Effect of interval (7 or 11 weeks) between neoadjuvant radiochemotherapy and surgery on complete pathologic response in rectal cancer: a multicenter, randomized, controlled trial (GRECCAR-6)", *J Clin Oncol*, 34, pp. 3773-80.
163. Levin B, Lieberman DA, McFarland B *et al* (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", *Gastroenterology*, 134(5), pp. 1570-95.
164. Li MM, Datto M, Duncavage EJ *et al* (2017): "Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists". *J. Mol. Diagnostics* 19, 4-23.
165. Liang PS, Chen TY y Giovannucci E (2009): "Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis", *Int J Cancer*, 124(10), pp. 2406-15.
166. Liao X, Morikawa T, Lochhead P *et al* (2012): "Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review", *Clin Cancer Res*, 18, pp. 2257-2268.
167. Lieberman DA (2009): "Clinical practice. Screening for colorectal cancer", *N Engl J Med*, 361(12), pp. 1179-87.
168. Lièvre A, Bachet JB, Boige V *et al* (2008): "KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab", *J Clin Oncol*, 26, pp. 374-379.
169. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D *et al* (2006): "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer", *Cancer Res*, 66, pp. 3992-3995.
170. Limsui D, Vierkant LA, Tillmans LS *et al* (2012): "Postmenopausal hormone therapy and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes among older women", *Gut*, 61, pp. 1299-305.
171. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O *et al* (2002): "Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors", *J Clin Oncol*, 20, pp. 1043-1048.
172. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW *et al* (2006): "Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review", *JAMA*, 296, pp. 1507.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

173. Liu Y, Sethi NS, Hinoue T *et al* (2018): "Comparative molecular analysis of gastrointestinal adenocarcinomas", *Cancer Cell*, 33, pp. 721-735.
174. Loomans-Kropp HA y Umar A (2019): "Increasing Incidence of Colorectal Cancer in Young Adults", *J Cancer Epidemiol*, 9841295.
175. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI *et al* (1993): "Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history", *Cancer Res*, 53, pp. 5849-5852.
176. Low EE, Demb J, Liu L *et al* (2020): "Risk factors for early-onset colorectal cancer". *Gastroenterology* 159(2):492-501.e7.
177. Luo Y, Wong CJ, Kaz AM *et al* (2014): "Differences in DNA methylation signatures reveal multiple pathways of progression from adenoma to colorectal cancer", *Gastroenterology*, 147(2), pp. 418-29.e8.
178. Lynch HT y de la Chapelle A (2003): "Hereditary colorectal cancer", *N Eng J M*, 348, pp. 919-932.
179. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ *et al* (2009): "Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications", *Clin Genet*, 76(1), pp. 1-18.
180. Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ *et al* (1988): "Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II)", *Dis Colon Rectum*, 31, pp. 439-44.
181. Maas M, Beets-Tan RGH, Lambregts DMJ *et al* (2011): "Wait-and-see policy for clinical complete responders after chemoradiation for rectal cancer", *J Clin Oncol*, 29, pp. 4633-4640.
182. Maida M, Macaluso FS, Ianiro G *et al* (2017): "Screening of colorectal cancer: present and future", *Expert Rev Anticancer Ther*, 17(12), pp. 1131-1146.
183. Makec M, Mercier B, Mackova A *et al* (1997): "Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene", *Hum Mutat*, 9, pp. 136-147.
184. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P *et al* (2018): "European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer", *Ann Oncol*, 29:1016-1022.
185. Mann B, Gelos M, Siedow A *et al* (1999): "Target genes of beta- catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas", *Proc Natl Acad Sci*, 96, pp. 1603-1608.
186. Martín R, Miquel S, Benevides L *et al* (2017): "Functional Characterization of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of F. prausnitzii as a Next-Generation Probiotic Front Microbiol", 8, pp. 1226.
187. Martin-Perez B, Andrade-Ribeiro GD, Hunter L *et al* (2014): "A systematic review of transanal minimally invasive surgery (TAMIS) from 2010 to 2013", *Tech Coloproctol*, 18, pp. 775-88.
188. Marzouk O y Schofield J (2011): "Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer", *Cancers (Basel)*, 3(2), pp. 2767-2810.
189. McDonald PC, Chafe SC, Brown WS *et al* (2019): "Regulation of pH by carbonic anhydrase 9 mediates survival of pancreatic cancer cells with activated KRAS in response to hypoxia", *Gastroenterology*, 157, pp. 823-837.
190. Meta-analysis Group in Cancer (1998): "Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer", *J Clin Oncol*, 16, pp. 301-8.
191. Mik M, Berut M, Dziki L *et al* (2017): "Right and left-sided colon cancer - clinical and pathological differences of the disease entity in one organ", *Arch Med Sci*, 13(1), pp. 157-162.
192. Molinari C, Ballardini M, Teodorani N *et al* (2011): "Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study", *Radiat Oncol*, 6:161.
193. Molinari C, Ballardini M, Teodorani N *et al* (2011): "Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study", *Radiat Oncol* 6:161
194. Mulder SA, Kranse R, Damhuis RA *et al* (2011): "Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer: a Dutch population-based study", *Cancer Epidemiol*, 35(5), pp. 442-7.
195. Nagtegaal ID, Marijnen CAM *et al* (2002): "Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit", *Am J Surg Pathol*, 26, pp. 350-7.
196. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV *et al* (2004): "Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles", *Oncogene*, 23, pp. 7366-7377.
197. Nguyen LN, Goel A y Chung DC (2020): "Pathways of Colorectal Carcinogenesis", *Gastroenterology*, 158(2), pp. 291-302.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

198. Niekel MC, Bipat S y Stoker J (2010): "Diagnostic imaging of colorectal liver metastases with CT, MR imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: a meta-analysis of prospective studies including patients who have not previously undergone treatment", *Radiology*, 257(3), pp. 674-84.
199. Nieuwenhuis MH y Vasen HF (2007): "Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature", *Crit Rev Oncol Hematol*, 61, 153-161.
200. Nishihara R, Wu K, Lochhead P *et al* (2013): "Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lowerendoscopy", *N Engl J Med*, 369, pp. 1095-1105.
201. Nitsche U, Friess H, Agha A *et al* (2016): "Prognosis of mucinous and signet-ring cell colorectal cancer in a population-based cohort", *J Cancer Res Clin Oncol* 142(11):2357-66.
202. Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M *et al* (2008): "PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations", *Neoplasia*, 10, pp. 534-541.
203. Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ *et al* (2012): "Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer", *J Clin Oncol*, 30, pp. 2552.
204. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM *et al* (2005): "Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences", *Nucleic Acids Res*, 33(14), pp. e 128.
205. O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH *et al* (2003): "Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults", *Am Surg*, 69, pp. 866-72.
206. O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn M *et al* (1998): "Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer", *J Clin Oncol*, 16, pp. 295-300.
207. O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ *et al* (1997): "Controlled trial of fluorouracil and low dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer", *J Clin Oncol*, 15, pp. 246-50.
208. Ogino S, Cantor M, Kawasaki T *et al* (2006): "CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies", *Gut*, 55(7), pp. 1000-1006.
209. Ogino S, Goel A (2008): "Molecular classification and correlates in colorectal cancer", *J Mol Diagn* 10:13e27.
210. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ *et al* (2007): "Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample", *J Mol Diagn*, 9, pp. 305-14.
211. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ *et al* (2008): "A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer", *J Natl Cancer Inst*, 100, pp. 1734-1738.
212. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL *et al* (1996): "Suppression of intestinal polyposis in ApcD716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)", *Cell*, 87, pp. 803-809.
213. Pasha SF, Shergill A, Acosta RD *et al* (2014): "The role of endoscopy in the patient with lower GI bleeding". *Gastrointest Endosc* 79:875-885.
214. Patel SG, Ahnen DJ (2018): "Colorectal Cancer in the Young". *Curr Gastroenterol Rep* 20, 15.
215. Patel SG, Karlitz JJ, Yen T *et al* (2022): "The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection". *Lancet Gastroenterol Hepatol* 7(3): 262-274.
216. Patel SS, Floyd A, Doorly MG *et al* (2012): "Current controversies in the management of colon cancer", *Curr Probl Surg*, 49(7): 398-460.
217. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B *et al* (2017): "Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer", *JAMA Oncol*, 3, pp. 464-471.
218. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B *et al* (2017): "Prevalence and spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations among patients with early-onset colorectal cancer". *JAMA Oncol* 3:464-71.
219. Perea García J, Arribas J, Cañete A *et al* (2019): "Association of polyps with early-onset colorectal cancer and throughout surveillance: novel clinical and molecular implications". *Cancers* 9;11(12):1900.
220. Perea J, Cano JM, Rueda D *et al* (2015): "Classifying early-onset colorectal cancer according to tumor location: new potential subcategories to explore", *Am J Cancer Res*, 5(7), pp. 2308-13.
221. Perea J, García JL, Pérez J *et al* (2017): "NOMO1 is deleted in early-onset colorectal cancer". *Oncotarget* 18;8(15):24429-36.
222. Perea J, Lomas M, Hidalgo M (2011): "Bases moleculares del cáncer colorrectal. ¿Hacia un manejo individualizado?", *Rev Esp Enferm Dig* 103 (1): 29-35.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

223. Perea J, Rueda D, Canal A *et al* (2014): "Age at onset should be a major criterion for subclassification of colorectal cancer", *J Mol Diagn*, 16, 116-26.
224. Peterse EFP, Meester RGS, Siegel RL *et al* (2018): "The impact of the rising colorectal cancer incidence in young adults on the optimal age to start screening: microsimulation analysis I to inform the American Cancer Society colorectal cancer screening guideline". *Cancer* 124(14):2964-73.
225. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S *et al* (2011): "Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection-systematic review and meta-analysis", *Radiology*, 259(2), pp. 393-405.
226. Pilarski R, Stephens JA, Noss R *et al* (2011): "Predicting PTEN mutations: an evaluation of Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome clinical features", *J Med Genet*, 48, pp. 505-512.
227. Pilozi E, Maresca C, Duranti E *et al* (2015): "Left-sided early-onset vs late-onset colorectal carcinoma: histologic, clinical, and molecular differences", *Am J Clin Pathol*, 143, pp. 374-84.
228. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y *et al* (1992): "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis", *Nature*, 359(6392), pp. 235-237.
229. Pruitt K y Der CJ (2001): "Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis", *Cancer Lett*, 171, pp. 1-10.
230. QUASAR Collaborative Group (2000): "Comparison of fluorouracil with additional levamisole, higher dose folinic acid, or both, as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: a randomised trial", *Lancet*, 355, pp. 1588-96.
231. Quirke P, Steele R, Monson J *et al* (2009): "Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial", *Lancet*, 373, pp. 821-8.
232. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C *et al* (2002): "Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status", *Nature*, 418(6901), pp. 934.
233. Ramji KM, Cleghorn MC, Josse JM *et al* (2016): "Comparison of clinical and economic outcomes between robotic, laparoscopic, and open rectal cancer surgery: early experience at a tertiary care center", *Surg Endosc*, 30(4), pp. 1337-43.
234. REACCT Collaborative, Zaborowski AM, Abdile A *et al* (2021): "Characteristics of Early-Onset vs Late-Onset Colorectal Cancer: A Review". *JAMA Surg* 156(9):865-874.
235. Rennert G, Robinson E, Rennert HS *et al* (1995): "Clinical characteristics of metachronous colorectal tumors", *Int J Cancer*, 60:743-747.
236. Repici A, Pellicano R, Strangio G *et al* (2014): "Endoscopic mucosal resection for early colorectal neoplasia: pathologic basis, procedures and outcome", *Dis Colon Rectum*, 52, pp. 1502-15.
237. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA *et al* (2012): "Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel", *Am J Gastroenterol*, 107(9), pp. 1315-29, quiz 1314, 1330.
238. Rex DK, Boland CR, Dominitz JA *et al* (2017): "Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer", *Gastroenterology*, 153(1), pp. 307-323.
239. Rho YS, Gilabert M, Polom K *et al* (2017): "Comparing Clinical Characteristics and Outcomes of Young-onset and Late-onset Colorectal Cancer: An International Collaborative Study", *Clin Col Can*, 16: 4, 334-42.
240. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ *et al* (2003): "Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer", *N Engl J Med*, 349(3), pp. 247-257.
241. Rockey DC, Paulson E, Niedzwiecki D *et al* (2005): "Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: prospective comparison", *Lancet*, 365(9456), pp. 305-11.
242. Ruiz-Tovar J, Jiménez-Miramón J, Valle A *et al* (2010): "Endoscopic resection as unique treatment for early colorectal cancer", *Rev Esp Enferm Dig*, 102(7), pp. 435-41.
243. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K *et al* (2003): "A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy", *Nat Med*, 19, pp. 619-625.
244. Salahshor S, Koelble K, Rubio C *et al* (2001): "Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer", *Lab Invest*, 81, pp. 535-541.
245. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J *et al* (2005): "Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer", *Gastroenterology*, 129, pp. 837-845.
246. Schaid DJ, Stanford JL, McDonnell SK *et al* (2007): "Genome-wide linkage scan of prostate cancer Gleason score and confirmation of chromosome 19q". *Hum Genet* 121, 729-735.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

247. Scheithauer W, McKendrick J, Begbie S *et al* (2003): "X-ACT Study Group. Oral capecitabine as an alternative to iv. 5-fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomized, phase III trial", *Ann Oncol*, 14, pp. 1735-43.
248. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A *et al* (2012): "ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making", *Ann Oncol*, 23, pp. 2479-2516.
249. Schreiber IR, Baker M, Amos C *et al* (2005): "The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review", *Am J Gastroenterol*, 100, 476-490.
250. Seeber A y Gastl G (2016): "Targeted Therapy of Colorectal Cancer", *Oncol Res Treat*, 39(12), pp. 796-802.
251. Shimada Y, Kameyama H, Nagahashi M *et al* (2017): "Comprehensive genomic sequencing detects important genetic differences between right-sided and left-sided colorectal cancer", *Oncotarget*, 8:93567-93579.
252. Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF *et al* (2017): "Colorectal cancer incidence patterns in the United States", *J Nat Cancer Inst*, 109 (8), djw322.
253. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A (2024): "Colorectal cancer statistics, 2024". *CA Cancer J Clin* 74(1):12-49
254. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA *et al* (2017): "Colorectal cancer statistics", *CA Cancer J Clin*, 67(3), pp. 177-193.
255. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2018): "Cancer statistics", *CA Cancer J Clin*, 68:7-30.
256. Siegel RL, Torre LA, Soerjomataram I *et al* (2019): "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults", *Gut*, 68(12), pp. 2179-2185.
257. Silla IO, Rueda D, Rodríguez Y *et al* (2014): "Early-onset colorectal cancer: a separate subset of colorectal cancer", *World J Gastroenterol*, 20, pp. 17288-96.
258. Sinicrope FA, Shi Q, Allegra CJ *et al* (2017): "Association of DNA mismatch repair and mutations in BRAF and KRAS with survival after recurrence in stage III colon cancers. A secondary analysis of 2 randomized clinical trials", *JAMA Oncol*, 3, pp. 472-480.
259. Smothers L, Hyman L, Fleming J *et al* (2003): "Emergency surgery for colon carcinoma", *Dis Colon Rectum*, 46(1), pp. 24-30.
260. Sobin LH y Wittekind C (2002): *TNM Classification of Malignant Tumors*, 6ª edición, WileyLiss.
261. Song M, Garrett WS y Chan AT (2015): "Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention", *Gastroenterol*, 148(6), pp. 1244-60e16.
262. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B *et al* (1998): "Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer", *Cancer Res*, 58, pp. 1130-1134.
263. Staib L, Link KH, Blatz A *et al* (2002): "Surgery of colorectal cancer: surgical morbidity and five-and ten-year results in 2400 patients-monoinstitutional experience", *World J Surg*, 26, 59-66.
264. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK *et al* (2000): "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis", *N Engl J Med*, 342, pp. 1946-1952.
265. Stoffel EM y Kastrinos F (2014): "Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome", *Clin Gastroenterol Hepatol*, 12, pp. 1059-1068.
266. Stoffel EM, Murphy CC (2020): "Epidemiology and mechanisms of the increasing incidence of colon and rectal cancers in young adults", *Gastroenterology*, 158:341-353.
267. Stracci F, Forzi M y Grazzini G (2014): "Colorectal cancer screening: tests, strategies, and perspectives. Front Public Health", 2, pp. 210.
268. Sutter CM, Martin DI y Ward RL (2004): "Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers", *Nat Genet*, 36, 497-501.
269. Swartling T, Kålebo P, Derwinger K *et al* (2013): "Stage and size using magnetic resonance imaging and endosonography in neoadjuvantly-treated rectal cancer", *World J Gastroenterol*, 19(21), pp. 3263-71.
270. Tamas K, Walenkamp AM, de Vries EG *et al* (2015): "Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site". *Cancer Treat Rev* 41, 671-679.
271. Terdiman JP (2009): "MYH-associated disease: attenuated adenomatous polyposis of the colon is only part of the story", *Gastroenterology*, 137, pp. 1883-1886.
272. The Cancer Genome Atlas Network (2012): "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer", *Nature*, 487(7407), pp. 330-337.
273. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach and colon: November 30 to December 1, *Gastrointest Endosc*, 58 (Supl. 6), pp. S3-43.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

274. Tong L, Ahn C, Symanski E *et al* (2014): "Relative impact of earlier diagnosis and improved treatment on survival for colorectal cancer: a US database study among elderly", *Cancer Epidemiol*, 38(6), pp. 733-740.
275. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M *et al* (1999): "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer", *Proc Natl Acad Sci*, 96, pp. 8681-8686.
276. Tran B, Kopetz S, Tie J *et al* (2011): "Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer". *Cancer* 117, 4623-4632.
277. Tsaousis GN, Papadopoulou E, Apeessos A *et al* (2019): "Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations". *BMJ Cancer* 3; 19 (1): 535.
278. Valori R, Rey JF, Atkin WS *et al* (2012): "European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition-Quality assurance in endoscopy in colorectal cancer screening and diagnosis", *Endoscopy*, 44 Suppl 3, pp. SE88-105.
279. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B *et al* (2013): "European Crohn's and Colitis Organisation. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations", *J Crohns Colitis*, 7, pp. 1-33.
280. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B *et al* (2014): "Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up", *Ann Oncol*, 25 Suppl 3, pp. iii1-9.
281. Van de Velde CJ, Boelens PG, Borrás JM *et al* (2014): "EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum", *Eur J Cancer*, 50(1), pp. 1e1-1e34.
282. Van de Velde CJH, Aristei C, Boelens PG *et al* (2013): "EURECCA colorectal: multidisciplinary mission statement on better care for patients with colon and rectal cancer in Europe", *Eur J Cancer*, 49, pp. 2784-90.
283. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM *et al* (1991): "The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)", *Dis Colon Rectum*, 34(5), pp. 424-5.
284. Vasen HF, Möslin G, Alonso A *et al* (2008): "Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP)", *Gut*, 57, pp. 704.
285. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP *et al* (1999): "New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC", *Gastroenterology*, 116(6), pp. 1453-6.
286. Ventura L, Mantellini P, Grazzini G *et al* (2014): "The impact of immunochemical faecal occult blood testing on colorectal cancer incidence", *Dig Liver Dis*, 46, pp. 82-86.
287. Vuik FE, Nieuwenburg SA, Bardou M *et al* (2019): "Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years", *Gut*, 68(10), pp. 1820-1826.
288. Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G *et al* (2002): "Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germline MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families", *Cancer Res*, 62, pp. 3485-349.
289. Wang D, Fu L, Sun H *et al* (2015): "Prostaglandin E2 promotes colorectal cancer stem cell expansion and metastasis in mice", *Gastroenterology*, 149, pp. 1884-1895.
290. Wang Y, Friedl W, Lamberti C *et al* (2003): "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes", *Int J Cancer*, 103, pp. 636-641.
291. Waye JD (2001): "Endoscopic mucosal resection of colon polyps", *Gastrointest Clin N*, 3, pp. 537-48.
292. Weitz J, Koch M y Debus J (2005): "Colorectal cancer", *Lancet*, 365, pp. 153-65.
293. Wijnen J, Khan PM, Vasen H *et al* (1996): "Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16", *Am J Hum Genet*, 58, pp. 300-307.
294. Wijnen J, Vasen H, Khan PM *et al* (1995): "Seven new mutations in hMSH2, an HNPCC gene, identified by denaturing gradient gel electrophoresis", *Am Hum Genet*, 56, pp. 1060-1066.
295. Win AK, Parry S, Parry B *et al* (2013): "Risk of metachronous colon cancer following surgery for rectal cancer in mismatch repair gene mutation carriers", *Ann Surg Oncol*, 20, pp. 1829-1836.
296. Winawer S, Fletcher R, Rex DK *et al* (2003): "Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale update based on new evidence", *Gastroenterology*, 124, pp. 544-60.
297. Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR *et al* (2018): "Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society", *CA Cancer J Clin*, 68(4), pp. 250-281.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

298. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer. Disponible en: <https://www.wcrf.org/dietandcancer> [última consulta 6/12/20].
299. Worthley DL, Whitehall VL, Buttenshaw RL *et al* (2010): "DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer", *Oncogene*, 29, pp. 1653-1662.
300. Xu X, Li J, Sun X *et al* (2015): "Tumor suppressor NDRG2 inhibits glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer cells by repressing c-Myc expression". *Oncotarget* 6, 26161–26176.
301. Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK *et al* (2009): "Clinical, path- ologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma", *Am J Surg Pathol*, 33:572–582.
302. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA *et al* (2012): "Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism", *Cell*, 149, pp. 656-670.
303. Yiu R, Qiu H, Lee SH *et al* (2005): "Mechanisms of microsatellite instability in colorectal cancer patients in different age groups", *Dis Colon Rectum*, 48, pp. 2061-2069.
304. You YN, Xing Y, Feig BW *et al* (2012): "Young-onset colorectal cancer: is it time to pay attention?", *Arch Intern Med*, 172 (3), pp. 287-9.
305. Zhao M, Liu H, Tam Y *et al* (2017): "Prognostic factors for patients with colorectal cancer who are 75 years and older", *Oncotarget*, 8:80002–11.
306. Zhou HT, Shi ZZ, Zhou ZX *et al* (2013): "Genomic changes in rectal adenocarcinoma associated with liver metastasis. *Cancer Biomark*". *Sect Dis Markers* 13, 281-288.
307. Zong L, Abe M, Ji J *et al* (2016): "Tracking the correlation between CpG island methylator phenotype and other molecular features and clinicopathological features in human colorectal cancers: a systematic review and metaanalysis", *Clin Transl Gastroenterol*, 7(3), e151.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado para la recogida de muestras.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO O SANGRE CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Finalidad y descripción del proceso

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de parte de la muestra sobrante de tejido o sangre que le van a extraer, con el fin de utilizar dicho sobrante en investigación biomédica relacionada con el cáncer. Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

La principal vía de obtener dichos tejidos o sangre que permitan la investigación biomédica son las muestras sobrantes de las extracciones que se hacen con fines diagnósticos. Parte de la muestra de tejido o sangre no es necesaria para el correspondiente estudio y para establecer un diagnóstico y por ello, es normalmente destruida.

Usted como paciente puede donar el sobrante de su muestra para que, en lugar de ser destruido, pueda ser utilizado en investigación biomédica relacionada con el cáncer. La finalidad de la donación es dotar a los investigadores de tejido o sangre para que puedan desarrollar avances en el terreno del conocimiento sobre el cáncer, en particular sobre su aparición, evolución y tratamiento.

El consentimiento que ahora presta no supone para usted ningún riesgo o molestia adicional ya que únicamente va a autorizar la investigación con muestras sobrantes de tejido o sangre, que de otra forma se desecharían. Para la obtención de este material, no se llevará a cabo ninguna prueba o intervención distinta de aquella en la que se obtiene la muestra de tejido o sangre para su estudio.

La donación de este sobrante de tejido/ sangre es voluntaria por lo que, si Ud. da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo. En caso de producirse esta revocación ello no supondrá ningún cambio en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico /tratamiento y/o seguimiento. En caso de revocación su muestra dejará de formar parte de la investigación, aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma.

Carácter altruista de la donación

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea, lógicamente, renunciante. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en este estudio. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de la muestra incorporada y de los resultados de la investigación corresponderá al Hospital 12 de Octubre y, en su caso, al investigador. Las muestras podrán ser cedidas a otros grupos de investigación bajo acuerdos de colaboración y siempre para la investigación biomédica del cáncer.

Protección de datos y confidencialidad

Los datos personales que se recojan sobre Usted, serán confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose los mismos únicamente de acuerdo con los objetivos en el presente comunicado descritos, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial. Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

En el momento que usted consienta el uso de excedente de muestra para los fines de investigación aplicada descrito, dicho excedente (incluyendo terapias experimentales) será sometido a un proceso de disociación. Es decir, sólo será identificado por un número y/o un código constanding todos sus datos debidamente codificados, por lo que los investigadores implicados nunca conocerán su identidad o dato alguno que pudiera llegar a identificarle; sin embargo, los mismos, sí podrán en todo caso acceder a otros datos como su sexo o edad, pero siempre manteniendo la debida confidencialidad conforme a la legislación vigente.

De igual modo, sus datos personales serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, con la finalidad de gestionar el uso del excedente cedido por usted para los fines de investigación descrito en el presente comunicado, pudiendo ejercer en cualquier momento, los derechos de

acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal.

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio / proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo.

Información sobre resultados del estudio

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio / proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo. Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para Ud.

Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser tanto clínica como genéticamente relevantes para Ud e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así Ud lo estima oportuno. Un facultativo del Hospital 12 de Octubre se compromete a ofrecerle consejo genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados del estudio.

Asimismo, podría obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a Ud decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de esta hoja.

La muestra

La muestra formará parte de un banco de muestras o tumores hasta su uso en el proyecto de investigación pudiendo ser cedida a otros investigadores, los que a su vez podrán realizar ensayos relacionados con la finalidad para la que Ud haya donado la muestra. Estos investigadores no tendrán en ningún momento, como ya se ha indicado anteriormente, acceso a su identidad.

Le Agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento del cáncer.

DATOS DEL PACIENTE
Apellidos
Nombre
Dirección

DNI	Nº historia clínica
Autoriza la comunicación de la información relevante derivada de la investigación	SI NO
Firma Manifiesto que he recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas	Fecha



Hospital Universitario
12 de Octubre

SaludMadrid

Comunidad de Madrid



CONSENTIMIENTO INFORMADO

D.N.I. del paciente: _____

Fecha: ____/____/____

Nombre del Médico que informa: _____

Nº Colegiado: _____

UNIDAD DE CÁNCER FAMILIAR. ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS PREDISPONENTES A CÁNCER DE COLON NO ASOCIADO A POLIPOSIS (CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO)

En la mayoría de las ocasiones el cáncer de colon se presenta con carácter esporádico. Existen algunas familias en las que se observa que el número de casos es superior a lo que cabría esperar en la población general, sin que ello se acompañe de poliposis intestinal y acompañados de una elevada incidencia de tumores como el de estómago, vías biliares, endometrio u ovario entre otros. Estudios recientes han puesto de manifiesto que algunas de estas familias presentan mutaciones en alguno de sus genes que son los responsables de este hecho.

Estas mutaciones se transmiten de padres a hijos, igual que se transmiten otros caracteres físicos (como, por ejemplo, el color del pelo) y su presencia supone un aumento del riesgo de desarrollar a lo largo de la vida un cáncer de colon, recto, endometrio y en menor medida de otros tumores como los mencionados anteriormente.

La presencia de una de las mutaciones citadas en una persona no significa que se tenga la certeza absoluta de que este individuo vaya a desarrollar este tipo de tumor, únicamente indica que existe un riesgo mayor al de la población general.

Por el contrario, la ausencia de dicha mutación no puede garantizar la no aparición del cáncer, puesto que es posible que existan otras mutaciones hoy en día desconocidas y que por lo tanto no pueden ser estudiadas o simplemente que no hayan sido detectadas y por otro lado siempre persiste el riesgo de desarrollar un cáncer de forma esporádica (no hereditario).

Su caso ha sido valorado por una Unidad de Consejo Genético en Cáncer Familiar que, a la vista de sus antecedentes familiares, ha considerado la posibilidad de proceder a un estudio molecular con el fin de determinar si posee alguna alteración genética de las que hoy en día conocemos como responsables del "Síndrome de Cáncer de Colon Hereditario no Polipósico".

El análisis se realiza sobre una muestra de sangre extraída a tal efecto una vez otorgado el consentimiento, valorándose de forma exclusiva factores genéticos relacionados con este síndrome sin que pueda ser utilizada para otros fines ni para estudiar otros aspectos que no sean los relacionados con este tipo de tumores. En ocasiones y previo al estudio de mutaciones en sangre debe procederse a un estudio del tejido tumoral para lo cual puede ser preciso solicitar muestras de tejido al servicio de Anatomía patológica correspondiente.

La información sobre los resultados es estrictamente confidencial y únicamente será facilitada a la persona estudiada y a quienes ella nos autorice por escrito. Estos datos quedarán bajo la custodia de la Unidad de Consejo Genético que le atiende, sin que consten en su historial clínico y no podrán ser cedidos a ninguna entidad o persona sin su autorización expresa. Los datos podrán ser utilizados con el fin de realizar estudios epidemiológicos, garantizando en todo momento el anonimato. Si, no obstante lo anteriormente expuesto, en algún momento usted decide que esta información sea destruida, podrá solicitarlo por escrito a la persona responsable de la Unidad que le ha estudiado.

Si su análisis genético es negativo, es decir, no se encuentra ningún tipo de mutación que suponga especial predisposición al cáncer, se le indicarán cuáles son las medidas de prevención a tomar y que dependerán de la existencia o no de casos de portadores de la mutación conocidos en su familia.

Si su análisis genético es positivo se le informará sobre el riesgo existente, así como de las alternativas de prevención disponibles en la actualidad.

En ocasiones se puede obtener un resultado que denominamos no informativo. Este tipo de resultados implica que no se conoce en la actualidad las repercusiones que ciertas alteraciones detectadas puede tener sobre el riesgo de padecer cáncer de colon.

Continúa al dorso

04 554

Cuando la existencia de la mutación en la familia ha sido confirmada, debe saber que otros miembros de su familia pueden haberla heredado: de usted (en caso de sus descendientes) o de sus antepasados (en caso de otros familiares como tíos o primos). La Unidad de Consejo Genético en ningún caso contactará con ellos por propia iniciativa para advertirles de esta circunstancia, ya que esta información es estrictamente confidencial. Es decisión personal suya informar a dichos familiares con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo individual con respecto a estos tumores.

De igual manera debe conocer que este tipo de pruebas pueden repercutir en su estado emocional y/o psicológico, tanto positiva como negativamente.

Si usted decide que no desea realizarse un estudio genético, sepa que su decisión será respetada en todo momento y recibirá el asesoramiento genético apropiado a su caso. De igual manera debe saber que existen modelos teóricos que permiten conocer de manera aproximada su riesgo de padecer determinados tipos de cáncer, los cuales podrían aplicársele si no desea realizarse este tipo de test.

Comentarios del médico que informa: _____

AUTORIZACIÓN

Yo, _____, he sido informado oralmente y por escrito sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio genético en el cáncer.

He comprendido esta información y cualquier duda surgida me ha sido aclarada por el médico.

Por lo anterior **OTORGO MI CONSENTIMIENTO** para que se proceda al estudio de factores genéticos predisponentes al cáncer sobre una muestra de sangre que me será extraída a tal efecto y análisis de tejido tumoral si ello fuera necesario.

Firma
 Fecha:

Firma tutor (caso de menor o incapacitado legalmente)
 Fecha:

Firma Médico
 Fecha:

Autorizo para que las personas abajo indicadas puedan ser informadas sobre los resultados del estudio realizado.

Nombre	TF
Nombre	TF
Nombre	TF
Nombre	TF

Fdo.: D. /D^a

Fecha:

REVOCACIÓN

En ejercicio del derecho que tengo de anular el consentimiento prestado manifiesto mi voluntad de revocarlo y solicito se proceda a la destrucción de las muestras sanguíneas extraídas y de la información de ellas obtenida.

ANEXO 2. Proceso bioquímico detallado para el análisis molecular de las muestras de ADN

1. Proceso de tinción con hematoxilina-eosina y proceso de extracción de ADN de las muestras de tejido tumoral

1.1. Proceso de tinción con hematoxilina-eosina

Se realiza un corte de 3 μm del bloque de tejido parafinado con la ayuda de un microtomo, el cual se incuba a 70°C durante 1 hora. Tras la incubación, se añade xilol durante 2 minutos para eliminar la parafina, repitiendo el proceso dos veces. Se aplica a la muestra etanol para su hidratación, primero con etanol puro durante 2 minutos y, posteriormente, con etanol al 95% durante otros 2 minutos, tras lo cual se lava con agua destilada 2 minutos más. Se tiñe la muestra con hematoxilina de Mayer durante 15 minutos y se lava de nuevo durante 2 minutos con agua destilada. Se tiñe la muestra con eosina durante 2 minutos y se lava con etanol al 70%, para eliminar los restos de eosina. Se deshidrata la muestra, en varias fases: con etanol al 96% durante 30 segundos, con etanol puro durante 2 minutos y con xilol durante 2 minutos (dos veces). Finalmente, se monta el cubre-muestras con Eukitt o DPX.

1.2. Proceso de extracción de ADN

Una vez teñido el tejido con hematoxilina-eosina y estudiada la proporción de células tumorales y normales, se procede a la extracción de ADN de la muestra parafinada: se realizan tres cortes de 10 μm y se colocan en un tubo de 1.5 ml; para eliminar la parafina, se añade 1 ml de xilol y se incuba a 65°C durante 5 minutos, posteriormente, se centrifuga a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos y se retira el sobrenadante; si persiste algún resto de parafina, se repite el paso anterior; se añade 1 ml de etanol puro y se incuba a 65°C durante 5 minutos, se centrifuga nuevamente a 12.000 rpm durante 10 minutos y se retira el sobrenadante; se añade 1 ml de etanol al 50% y se incuba a 65°C durante 5 minutos, se centrifuga nuevamente con los mismos parámetros y se retira el sobrenadante, se deja secar hasta que desaparezca el etanol; se añaden 400 μl de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2.5 mM MgCl_2 , 0.45% *Nonidet P40*, 4.5% *Tween 20*), se añaden 40 μl (1/10 de volumen de tampón) de proteinasa K (10 mg/ml) y se incuba a 55°C hasta que el tejido esté completamente digerido, si persistieran restos de tejido tras varias horas de incubación, se añade nuevamente el tampón y la proteinasa K o se centrifuga brevemente separando el sobrenadante; se centrifuga de nuevo la muestra y se añaden 440 μl de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, trasladando la mezcla a una columna de purificación *Phase Lock Gel™ Light* (Eppendorf AG, Hamburg Alemania); se incuba en rotación durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifuga a 12.000 rpm, durante 5 minutos; se selecciona la fase acuosa superior y se traslada a un nuevo tubo *Phase Lock Gel™ Light* añadiendo nuevamente

440 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, se incuba de nuevo en rotación con los mismos parámetros que en el paso previo; se selecciona nuevamente la fase acuosa resultante y se traslada a un tubo de 1.5 ml añadiendo 440 µl de cloroformo, se incuba de nuevo en rotación con los mismos parámetros y se vuelve a recoger la fase acuosa en un tubo de 1.5 ml; se suman 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío, a continuación, se deja precipitar el ADN a -20°C durante toda la noche; se centrifuga a 4°C a 12.000 rpm durante 15 minutos y se retira el sobrenadante, posteriormente, se lava con 1 ml de etanol frío al 75%; por último, se repite el centrifugado a 4°C a 12.000 rpm, en esta ocasión durante 10 minutos, retirando el sobrenadante y dejando secar para eliminar completamente el etanol. Se resuspende el ADN en agua destilada estéril.

2. Proceso de extracción de ADN genómico de las muestras de sangre periférica

2.1. Extracción manual

Para el análisis del ADN genómico en sangre periférica extraído de forma manual se empleó el kit *DNA purification system Puregene* (Gentra Systems Minneapolis MN): se introducen 10 ml de la muestra de sangre obtenida en un tubo Falcon de 50 ml, se añaden 30 ml de suero fisiológico carabamifosfato sintetasa y se agita para homogeneizar la muestra, posteriormente se incuba durante 5 minutos; se centrifuga a 4°C a 3.000 rpm durante 15 minutos, posteriormente se desecha el sobrenadante para conservar el sedimento de leucocitos en un volumen de 200-400 µl; se agita para resuspender las células, se añaden 10 ml de *CellLysis Solution + RNase A Solution* y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente, se vuelve a centrifugar la muestra a 4°C a 3.000 rpm durante 15 minutos; se añaden 3.5 ml de *Protein Precipitation Solution* a las células lisadas, se agita durante 20 segundos y se vuelve a centrifugar con los parámetros previos; se desecha el volumen con el residuo de proteínas y se pasa el sobrenadante que contiene la suspensión de ADN a un nuevo tubo Falcon de 50 ml; se añaden dos volúmenes de alcohol etílico absoluto respecto a la cantidad de tampón de lisis de leucocitos empleado, para luego agitar con suavidad, hasta lograr apreciar el ovillo de ADN; se extrae el ovillo de ADN con una pipeta Pasteur esterilizada y se pasa por dos tubos consecutivos con etanol frío al 70%, para eliminar impurezas; se deja secar durante 5 minutos hasta que desaparezcan todos los restos de etanol y se vuelve a suspender en 30 µl de agua destilada estéril; por último, es necesario agitar el recipiente durante 2 horas a 37°C para conseguir la correcta disolución del ADN.

2.2. Extracción automática

Para la extracción automática del ADN genómico a partir de una muestra de sangre periférica se utiliza el sistema *MagNa Pure LC* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

A partir de una muestra de 1 ml de sangre periférica, el sistema añade: 0.115 ml de solución de proteinasa K para la digestión de proteínas, 0.84 ml de tampón lisis-unión para la lisis celular y conseguir la situación salina idónea para la retención del ADN, 0.54 ml del reactivo MGP para la retención del ADN mediante partículas magnéticas, 2.42 ml de tampón de lavado I para eliminar todo el material que no se encuentre unido a dichas partículas, como proteínas, membranas o heparina, 1.28 ml de tampón de lavado II para retirar restos celulares y reducir la concentración salina, 0.84 ml de tampón de lavado III para eliminar los restos de etanol; por último, 200 µl de tampón de disolución calentado para resuspender el ADN purificado.

3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2% para valoración de la cantidad y calidad del ADN obtenido

El protocolo para la electroforesis horizontal para el análisis de la cantidad y la calidad del ADN obtenido fue el siguiente: en un matraz de 250 ml se añaden 0.3 g de agarosa (agarosa Media, Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid) y 30 ml de tampón TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA) y se calienta hasta ebullición para disolver la agarosa; se añaden 3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se coloca la disolución en una bandeja que se sella por los extremos con cinta adhesiva con un peine en el borde, donde quedarán los pocillos de carga, se deja que el gel solidifique; cuando el gel se encuentra en estado sólido, se retira la cinta adhesiva y el peine y se coloca en una cubeta de electroforesis horizontal (Laboratorios Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña), cubriéndolo con el tampón TBE 1X; para iniciar la migración electroforética se añaden al pocillo de gel 2 µl de la muestra de ADN y el tampón de carga (glicerol, azul de bromofenol, xilencianol), posteriormente, se conecta a una fuente de alimentación y se deja migrar la muestra durante 20 minutos; se visualiza la intensidad de las bandas obtenidas en el gel mediante un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña).

Para determinar la cantidad y el grado de pureza de la muestra de ADN se utiliza un espectrofotómetro de luz ultravioleta *Beckman DU530* mediante el siguiente proceso: se realiza una dilución 1:200 del ADN extraído (2 µl de ADN en 400 ml de agua destilada) y se coloca en una cubeta de cuarzo recogiendo medidas con el espectrofotómetro de la densidad óptica a 260 nm y 280 nm de longitud de onda; los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a 260 nm, por lo que a esa longitud de onda la concentración puede ser calculada mediante la fórmula:

$$C = \frac{\text{Abs } 260 \times 100 \times \text{factor de dilución}}{L}$$

C: la concentración ($\mu\text{g/ml}$); Abs 260: la absorbancia a 260 nm; factor de dilución: volumen de la dilución dividido entre la cantidad alicuotada (en este trabajo el valor es de 200); L: coeficiente de extinción molar bicatenario ($0.02 \mu\text{g/ml}$).

La pureza del ADN se estima por medio de la relación de absorbancia a 260 nm y a 280 nm. El rango óptimo se sitúa entre 1.8 y 2.

4. Ensayo de PCR multiplex para el análisis de los microsatélites

El ensayo de PCR *multiplex* para el análisis de los microsatélites genera productos marcados con fluorescencia para poder analizarlos en un secuenciador *ABI* automático (*HNPCC Microsatellite Instability Test*, Roche, Mannheim, Alemania). El protocolo empleado es el recomendado por el fabricante:

- Se añaden los siguientes reactivos a un tubo de 0.2 ml, en hielo: 5 μl de *Multi Primer Mix* (mezcla de cebadores marcados con distintos fluorocromos para amplificar los 5 microsatélites), 5 μl de *Enzyme Master Mix* (mezcla de un tampón de reacción, ADN Taq polimerasa y dNTPs), 200 ng de ADN (X) y 25 μl de H_2O destilada y estéril (Y). Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 200 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 μl , dependerá del valor de X.
- La amplificación se realizó en un termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems), en las siguientes condiciones (figura VIII.1):

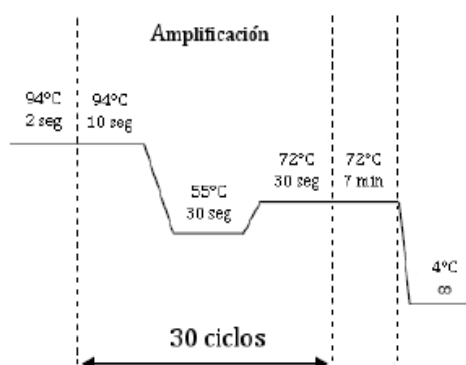


Figura VIII.1. Condiciones de tiempo y temperatura para el análisis de la IMS aplicadas en el protocolo de PCR *multiplex*.

- A continuación, para cada muestra se añaden 12 μl de formamida desionizada, 0.1 μl de un marcador de tamaño marcado con *TAMRA* (*TAMRA 500*) y 1 μl del producto de la PCR.
- Esta mezcla se analiza en un secuenciador *ABI Prism 3700* (PE Applied Biosystems) y se visualizan los resultados mediante el software *GeneScan 3.5* (figura III.1).

5. Estudio molecular de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2* Y *MSH6*)

5.1. Componentes y condiciones para el estudio de las mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*

Para la realización de la PCR para el estudio de las mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2* se utilizaron los siguientes componentes y condiciones: 2.5 μl de tampón PCR10X (BioTaq), 2 μl de dNTPs (1.25 mM), 2.5 μl de cebador sentido (10 mM), 2.5 μl de cebador antisentido (10 mM), 50 ng de ADN (X), 2 μl de ADN Taq polimerasa (1 U) (BioTaq) y 15 μl de agua destilada (Y). Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 50 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 μl , dependerá del valor de X.

La amplificación se realizó en un termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems), en las siguientes condiciones:

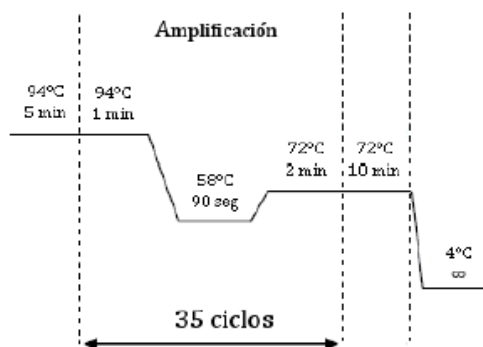


Figura VIII.2. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la PCR para el estudio de las mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*.

5.2. Protocolo para el análisis de grandes deleciones genómicas en *MLH1* y *MSH2*

El protocolo utilizado para el análisis fue el siguiente:

1. Desnaturalización e hibridación del ADN: Se diluyen 100 ng de ADN en TE (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 1 mM EDTA) hasta conseguir un volumen de 5 μ l. Se coloca en un termociclador a 98°C durante 5 minutos para su desnaturalización y, posteriormente, se deja enfriar hasta 25°C. Se añaden 1.5 μ l del tampón *MLPA* y 1.5 μ l de las sondas *SALSA P003 MLH1/MSH2*. Se incuba a 95°C durante 1 minuto y, posteriormente, a 60°C durante 16 horas.

2. Reacción de ligación: Se añaden los siguientes componentes en hielo para su mezcla: 3 μ l de tampón A de la ligasa 65, 3 μ l de tampón B de la ligasa 65, 25 μ l de agua destilada estéril y 1 μ l de ligasa 65. Se colocan 32 μ l de la mezcla anterior en un termociclador y se incuban a 54°C durante 15 minutos y, posteriormente, a 98°C durante 5 minutos.

3. PCR: Para la realización de la mezcla de la PCR se colocan: 2 μ l de cebadores *SALSA P003 MLH1/MSH2* (Sentido: 5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGA - 3', marcado con fluorocromo/ Antisentido: 5' - GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA - 3'); 2 μ l de tampón de dilución de enzima; 5.5 μ l de agua destilada estéril y 0.5 μ l de ADN Taq polimerasa *SALSA*. Aparte, en un tubo de 0.2 μ l se colocan: 4 μ l de tampón *SALSA* de PCR 10X, 26 μ l de agua destilada estéril y 10 μ l de la reacción de ligación. Se incuban en un termociclador a 60°C y se añaden 10 μ l de la mezcla de la PCR. La PCR se lleva a cabo en las siguientes condiciones:

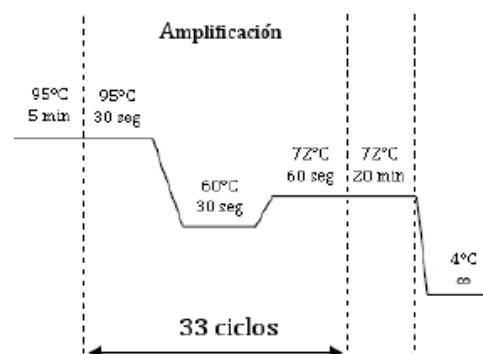


Figura VIII.3. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la PCR para el estudio de grandes deleciones genómicas en *MLH1* y *MSH2*.

Finalmente, se comprueba el resultado de la PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2.000*, Bio-Rad).

4. Visualización: Se añaden 12 μl de formamida desionizada y 0.1 μl de estándar interno *TAMRA-500* a 1 μl del producto de la PCR purificado. La mezcla resultante se analiza en un secuenciador *ABI PRIMS® 3700* (PE Applied Biosystems) y se visualizan los resultados mediante el software *GeneScan 3.5* (PE Applied Biosystems).

5.3. Estudio de mutaciones en el gen *MSH6*

El protocolo para la mezcla de la PCR para el estudio de las mutaciones en el gen *MSH6* se realizó incluyendo los siguientes elementos: 2.5 μl de tampón PCR 10X (Roche), 1.5 μl de MgCl_2 , 4 μl de dNTP (1'25 mM), 1 μl de cebador sentido (10mM), 1 μl de ADN Taq polimerasa (Roche) (1 U), 100 ng de ADN (X) y 25 μl de agua destilada (Y). Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 100 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 μl , dependerá del valor de X.

Para la realización de la PCR se utilizó un termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems), en las condiciones detalladas en la figura VIII.4:

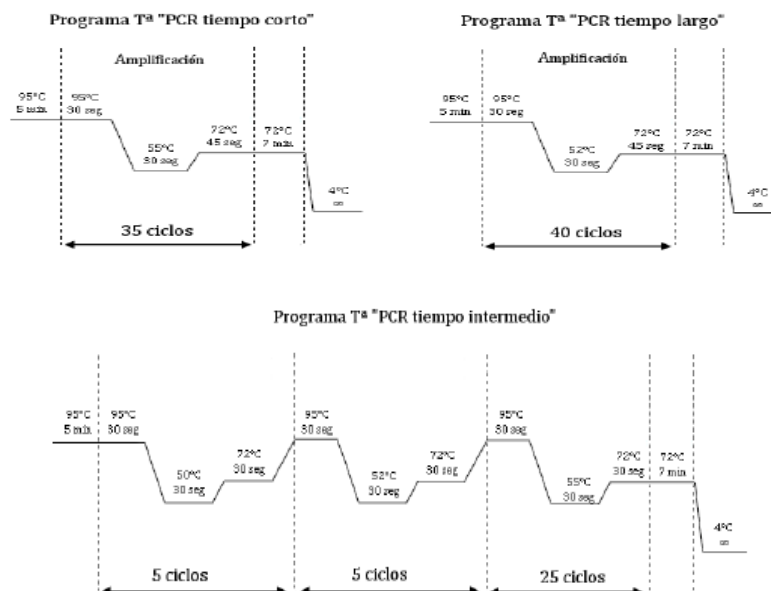


Figura VIII.4. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la PCR para el estudio de las mutaciones en el gen *MSH6*. Los tiempos y ciclos de reacción varían entre los distintos fragmentos de *MSH6*, distinguiéndose un programa para la PCR de tiempo corto, de tiempo largo y de tiempo intermedio.

5.4. Estudio de la hipermetilación del promotor del gen *MLH1*

5.4.1. Protocolo para la modificación con bisulfito sódico

Se mezclan 10 µl de ADN en una concentración de 100 ng/µl, 40 µl de agua destilada y 5.7 µl de NaOH 3 M y se desnaturaliza a 37°C durante 15 minutos. Se añaden 33 µl de hidroquinona 16.4 mM, 530 µl de bisulfito sódico 3.03 mM pH 5 y una gota de aceite mineral. Se incuba a 50°C durante 16 horas. Se separa el aceite de la muestra y se purifica mediante el kit *Wizard® DNA Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, USA). Se añade 1 ml de resina *DNA Clean-up*, se resuspende y se pasa a la jeringa. Se realiza un lavado de la columna con 1 ml de isopropanol al 80%, seguido de otro lavado con 800 µl de isopropanol al 80% y se transfiere nuevamente a un tubo de 1.5 ml. Se centrifuga a temperatura ambiente a 14.000 rpm durante 1 minuto para eliminar el isopropanol y se añaden 40 µl de agua destilada a 50°C para extraer el ADN. Se añaden 4.4 µl de NaOH y se incuba a 37°C durante 15 minutos. Se añaden 1 µl de glucógeno a concentración de 10 mg/ml, 17 µl de acetato amónico 10 M y 500 µl de etanol absoluto para precipitar el ADN a -80°C. Posteriormente, se centrifuga a 4°C a 14.000 rpm durante 15 minutos y se descarta el sobrenadante. Se lava el ADN resultante con 800 µl de etanol frío al 75% y se centrifuga nuevamente con los parámetros anteriores. Tras dejar secar el sedimento resultante de ADN, se resuspende en 20 µl de agua destilada.

5.4.2. Protocolo para la realización de las PCR específicas de presencia o ausencia de metilación

Para la realización de la mezcla de las PCR específicas de presencia o ausencia de metilación se añadieron: 2.5 µl de tampón PCR 10X (+MgCl₂), 4 µl de dNTP (1.25 mM), 0.5 µl de cebador sentido 20 mM, 0.5 µl de cebador antisentido 20 mM, ADN modificado bisulfito (X), 0.2 µl de ADN Polimerasa *Herculase®* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y agua destilada (Y). Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 100 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 µl, dependerá del valor de X.

La mezcla de la PCR fue amplificada en un termociclador *GeneAmp® 9700 de Perkin-Elmer* (PE Applied Biosystems), en las siguientes condiciones:

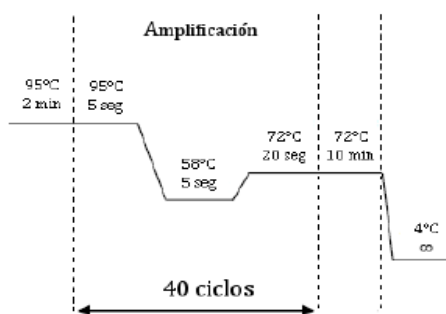


Figura VIII.5. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la PCR para el estudio de la hipermetilación del promotor del gen *MSH1*.

Por último, se añaden 6 μ l del producto obtenido en un gel de agarosa al 2% previamente teñido con bromuro de etidio y se visualiza con luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad).

5.4.3. Protocolo para la realización de las PCR no específicas del estado de metilación

Para la realización de la mezcla de las PCR no específicas del estado de metilación se añadieron: 2.5 μ l de tampón PCR 10X (+MgCl₂), 4 μ l de dNTP (1.25 mM), 1 μ l de cebador sentido 100 mM, 1 μ l de cebador antisentido 100 mM, 1.25 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido), ADN modificado bisulfito (X), 0.2 μ l de ADN polimerasa *Herculase® Enhanced DNA* y agua destilada. Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 100 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 μ l, dependerá del valor de X.

La mezcla de la PCR fue amplificada en un termociclador *GeneAmp® 9700 de Perkin-Elmer* (PE Applied Biosystems), en las mismas condiciones descritas en la figura VIII.5.

Igualmente, se añaden 6 μ l del producto obtenido en un gel de agarosa al 2% previamente teñido con bromuro de etidio y se visualiza con luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad).

Entre 2 y 7 μ l del producto de la PCR obtenido se digirieron con la enzima de restricción BstUI. Cuando las islas CpG no se encuentran metiladas, no serán reconocidas por la diana de restricción de esta enzima, mientras que si están metiladas la secuencia original se conserva y la enzima realiza el corte en la secuencia. Para ello, se utilizaron las condiciones recomendadas por el fabricante (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA), añadiendo: 1.5 μ l de tampón

1X NE 2 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ditiotritol 1 mM), 0.3 µl de BstUI (10 U/µl), 2-7 µl del producto de la PCR (X), agua destilada hasta un volumen final de 15 µl (Y). Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste entre 3 y 9 µl. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 15 µl, dependerá del valor de X.

La mezcla obtenida tras la digestión se incubó a 60°C durante 4 horas y se visualizó en un gel de agarosa al 3%.

6. Proceso para el estudio inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de errores de ADN (MLH1, MSH2, MSH6)

El proceso se realizó de la siguiente forma: se selecciona el tejido tumoral fijado en formol y se desparafinan las secciones de 4 µm a 36°C durante 12 horas; se hidratan las secciones 10 minutos en xileno (2 veces), 5 minutos en etanol puro, 5 minutos en etanol al 95%, 5 minutos en etanol al 70% y 2 minutos en agua destilada; se introduce en tampón de citrato sódico 10mmol/l a pH 5.6, durante 3 minutos y, posteriormente, en peróxido de hidrógeno al 3% (solución bloqueante S2023, DAKO, Glostrup, Dinamarca), a temperatura ambiente durante 5 minutos, se incuba en la dilución adecuada para cada anticuerpo primario y se aplican inmunoglobulinas anti-ratón (anticuerpo secundario) para la inmunodetección; posteriormente, se añaden estreptavidina marcada con peroxidasa y diaminobenzidina; se realizan las tinciones inmunohistoquímicas mediante el robot *TechMate 500* (DAKO); por último, se contratiñen las secciones con hematoxilina de Harry, se lavan y se deshidratan 30 minutos en etanol al 95%, 30 minutos en etanol al 100%, 10 minutos en xileno y 1 hora en xileno.

7. Procedimiento para la hibridación dentro del estudio de la inestabilidad cromosómica mediante arrays de CGH (*Comparative Genomic Hybridisation*)

El procedimiento para la hibridación fue el siguiente: se etiquetó el ADN tumoral con Cy3 (fluoróforo verde) y el ADN de referencia con Cy5 (fluoróforo rojo); se incubaron ambas muestras junto con el fragmento Klenow de la ADN Polimerasa y 5 mM de dNTP a 37°C durante 2 horas; se añadieron 21.5 µL de EDTA 0.5 M, se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol; se cuantificó el ADN resultante y se añadió 1 µg de la muestra problema y de la muestra control sobre un microarray de oligonucleótidos, utilizando una cámara de hibridación *NimbleGen Roche*, durante 48 horas; se lavaron las placas y se escanearon usando un *NimbleGen MS 200 Microarray scanner* que midió las intensidades de Cy3 y Cy5 a 532 y 635, respectivamente. Las

imágenes fueron procesadas mediante *MS 200 Data Collection Software* (Roche NimbleGen Inc.) e importadas al software *DEVA v1.2.1* (Roche NimbleGen Inc.), para su análisis.

Cada región genómica que exhibía un cambio en el número de copias se examinó utilizando la aplicación *UCSC genoma* (<http://genome.ucsc.edu/>), para determinar la ubicación y la importancia del cambio.

8. Protocolo para el estudio del estado mutacional de *BRAF*

La mezcla de la PCR se realizó añadiendo 3 ng de ADN, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ de cada primer, 3 mmol/L de MgCl_2 , solución de análisis de alta resolución de fusión *LightCycler LC480* (Roche), agua hasta completar un volumen final de 10 μL . Las condiciones para la PCR se describen en la figura VIII.6:

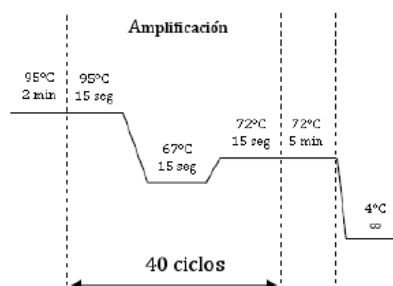


Figura VIII.6. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la técnica HRM para el estudio del estado mutacional de *BRAF*.

Los productos de la PCR fueron purificados con *ExoSAP-IT®* (Affymetric, Santa Clara, CA, USA) y secuenciados con el kit *BigDye® terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (PE Applied Biosystems) en un secuenciador automático *ABI PRIMS®3130* (Applied Biosystems).

9. Protocolo para el estudio de variantes somáticas mediante NGS

La primera etapa del procedimiento, la preparación de las librerías, se llevó a cabo a partir de 5 ng de ADN, previamente extraído de las muestras de tejido tumoral, y utilizando *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0* e *Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2* (Thermo Fisher Scientific Inc.) según el protocolo *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 User Guide* (Thermo Fisher Scientific Inc.) con algunas modificaciones. Para ello, se mezcló 5 ng de ADN en un volumen total de 6 μL junto con 2 μL de *5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix* más 2 μL de *5X Ion AmpliSeq™ primer pool* y se incubó siguiendo las condiciones indicadas en la figura VIII.7:

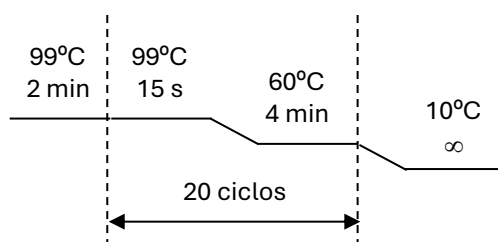


Figura VIII.7. Condiciones de tiempo y temperatura utilizadas para realizar las amplificaciones de las regiones de interés del panel de NGS.

Tras la amplificación, se realizó la digestión parcial de los *primers* mediante la adición de 1 μ L de *FuPa Reagent* y las condiciones detalladas en la figura VIII.8:

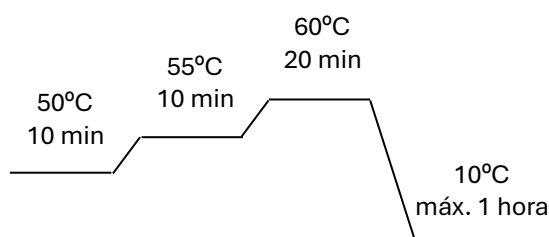


Figura VIII.8. Condiciones de tiempo y temperatura para llevar a cabo la digestión parcial de los *primers*.

A continuación, se llevó a cabo la ligación de los adaptadores (*barcodes*) mediante la adición de 2 μ L de *Switch Solution*, 1 μ L de *Ion Xpress™ barcode adapter mix*, previamente preparado utilizando *Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) y siguiendo las instrucciones del fabricante, más 2 μ L de *DNA Ligase*, siguiendo las condiciones de tiempo y temperatura de la figura VIII.9:

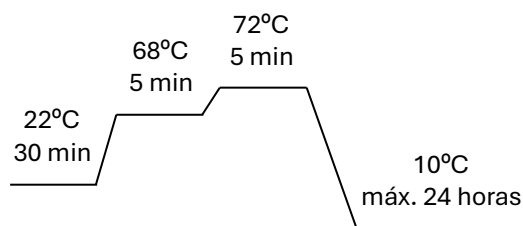


Figura VIII.9. Condiciones de tiempo y temperatura para llevar a cabo la ligación de los adaptadores en el panel de NGS.

Una vez finalizadas las librerías, y previa purificación con *Agentcourt AMPure® XP* (Beckman Coulter Inc.), se llevó a cabo su cuantificación mediante PCR cuantitativa (qPCR) usando *Ion Library TaqMan® Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) en un equipo *7500 Fast Real-Time PCR* (Applied BioSystems). Para ello, se realizaron diluciones 1/100 de las librerías y se prepararon diluciones seriadas de *E. coli DH10B Control Library* desde 6,8 pM a 0,0068 pM usadas como estándar. Se prepararon las mezclas de reacción utilizando 5 μ L de *2X Ion TaqMan® MasterMix*, 0,5 μ L de *20X Ion TaqMan® Assay* y 4,5 μ L de las librerías

diluidas o de los estándar. Y se siguieron las condiciones de tiempo y temperatura indicadas en la figura VIII.10:

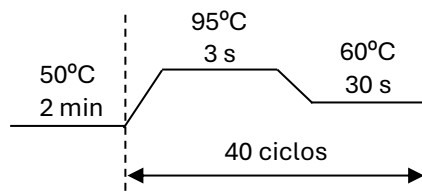


Figura VIII.10. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura para realizar la cuantificación de las librerías.

La siguiente etapa corresponde a la amplificación clonal de las librerías mediante PCR en emulsión, donde se crean microesferas que actúan como microreactores en los que una cadena de ADN se une a una partícula magnética y se replica de forma clonal. Se realizó utilizando *Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit* y el equipo *Ion OneTouch™ 2 System* (Thermo Fisher Scientific Inc.), siguiendo las indicaciones del protocolo *Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit User Guide* (Thermo Fisher Scientific Inc.). En resumen, en el tubo que contenía 800 µL de *Ion PGM™ Hi-Q™ View Reagent Mix* se añadió 25 µL de agua libre de nucleasas, 50 µL de *Ion PGM™ Hi-Q™ View Enzyme Mix*, 100 µL de *Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs* y 25 µL de la combinación de librerías a una concentración final de 8 pM. A continuación, se añadió 1000 µL de la mezcla a *Ion OneTouch™ Reaction Filter* seguido de la adición de 850 µL de *Ion OneTouch™ Reaction Oil* (dos veces). Después, se colocó *Ion OneTouch™ Reaction Filter* en el equipo *Ion OneTouch™ 2 System* ya inicializado, durante 14-16 horas donde se llevó a cabo la amplificación clonal. Por último, se recogió el producto obtenido y se realizó un enriquecimiento con el fin de seleccionar únicamente las esferas donde se realizó la correcta amplificación clonal. Para ello, se utilizó el equipo *Ion OneTouch™ 2 System* y una tira compuesta de 6 pocillos, donde se añadió 100 µL de producto obtenido tras la amplificación clonal en el pocillo 1, 130 µL de *Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads* en el pocillo 2, previamente preparado usando *Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads* y *MyOne™ Beads Wash Solution*, 300 µL de *Ion OneTouch™ Wash Solution* en los pocillos 3, 4 y 5, y 300 µL de *Melt-Off Solution*, previamente preparado combinando 280 µL de *Tween™ Solution* y 40 µL de NaOH a una concentración de 1 M. Por último, se añadió 10 µL de *Neutralization Solution* a un tubo donde se recogió el producto enriquecido destinado a ser secuenciado.

La etapa final del procedimiento es la secuenciación, se realizó utilizando *Ion 318™ Chip Kit v2* e *Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing kit* en el equipo *Ion PGM™ System* (Thermo Fisher Scientific Inc.), siguiendo las instrucciones del protocolo *Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit User Guide* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se comenzó creando un *Planned Run* mediante *Torrent Suite™ Software* (Thermo Fisher Scientific Inc.) con la información sobre la carrera (*kits* utilizados, *barcodes* de las muestras, tipo de muestras, genoma de

referencia...). Para realizar la carga de *Ion 318TM Chip*, se empezó añadiendo 5 μ L de *Control Ion SphereTM Particles* al producto enriquecido previamente obtenido, se realizó una centrifugación a 15500 g durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando, aproximadamente, unos 15 μ L, se añadió 12 μ L de *sequencing primer* y se incubó en un termociclador a 95°C durante 2 minutos y a 37°C otros 2 minutos. A continuación, se añadió 3 μ L de *Ion PGMTM Hi-QTM View Sequencing Polymerase* y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todo el volumen (30 μ L) fue cargado utilizando el puerto de carga de *Ion 318TM Chip* siguiendo las indicaciones detalladas en el protocolo. Para terminar, se introdujo el *Ion 318TM Chip* cargado en el *Ion PGMTM System* (Thermo Fisher Scientific Inc.) ya inicializado.

ANEXO 3. Differential clinicopathological and molecular features within late-onset colorectal cancer according to tumor location (Brandariz L et al.; 2018)

www.oncotarget.com Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 20), pp: 15302-15311

Research Paper

Differential clinicopathological and molecular features within late-onset colorectal cancer according to tumor location

Lorena Brandariz^{1,2}, María Arriba^{1,2}, Juan Luis García^{1,2}, Juana María Cano¹, Daniel Rueda^{1,2}, Eduardo Rubio¹, Yolanda Rodríguez¹, Jessica Pérez^{1,2}, Alfredo Vivas¹, Carmen Sánchez¹, Sandra Tapias¹, Laura Peña^{1,2}, Mariano García-Arriaza^{1,2}, Damián García-Olmo^{1,2}, Miguel Urioste^{1,2}, Rogelio González-Sarmiento^{1,2} and José Pera^{1,2}

¹Surgery Department, Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Madrid, Spain
²Biochemistry Department, Gregorio Marañón University Hospital, Madrid, Spain
³Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, Biomedical Research Institute of Salamanca (BISAL), Salamanca, Spain
⁴Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer (IMBCC), University of Salamanca-SACYC-CSC, Salamanca, Spain
⁵Oncology Department, Ciudad Real General Hospital, Ciudad Real, Spain
⁶Molecular Biology Laboratory, "12 de Octubre" University Hospital, Madrid, Spain
⁷Digestive Cancer Research Group, "12 de Octubre" Research Institute, Madrid, Spain
⁸Surgery Department, "12 de Octubre" University Hospital, Madrid, Spain
⁹Pathology Department, "12 de Octubre" University Hospital, Madrid, Spain
¹⁰Familial Cancer Clinical Unit, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain
¹¹Health Research Institute, Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Madrid, Spain
¹²Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

Correspondence to: José Pera, email: jperap@jimenezdia.com

Keywords: late-onset colorectal cancer, microsatellite instability, chromosomal instability, CpG island methylator phenotype, colon location

Received: November 27, 2017 Accepted: February 18, 2018 Epub: February 15, 2018 Published: March 16, 2018

Copyright: Brandariz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Background: Since there is a predilection of some clinical and molecular features for a given tumor location, we assessed whether this can be confirmed in late-onset colorectal cancer (LOCRC).

Results: Right colon cancers showed features associated with sporadic microsatellite instability: predominance of female cases and *BRAP* mutations, and an important mucinous component. Left colon cancers developed a higher number of polyps and multiple primary CRCs, showed the strongest familial component, and had better prognosis. Rectal cancers showed a predominantly sporadic phenotype, with worse prognosis and a CpG Island Methylator Phenotype (CIMP)-high. No copy number alterations (CNAs) greater than or equal to 50% were observed in this LOCRC group, and the most recurrent alterations were losses at 5q13 and 14q11, and gains at 7q11, 7q21-q22, 19p13-q12, 19q13 and 20p11-q11. *KRAS* and *PIK3CA* were the only mutated genes showing differences according to the tumor location, mainly for right colon cancers.

Materials and Methods: We analyzed clinical and molecular characteristics of LOCRC at different tumor locations in order to determine if there are differential phenotypes related with the location in the colon.

Conclusions: Categorizing LOCRC according to tumor location appears to be an adequate first step to resolving the heterogeneity of this subset of CRC.

www.oncotarget.com 15302 Oncotarget

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related deaths in western countries [1]. In its pathogenesis, both environmental and genetic factors play an important role. Hereditary CRC syndromes, such as Familial Adenomatous Polyposis (FAP) and Lynch syndrome (LS), are a minority of cases within CRC, and sporadic CRC is the key form. Sporadic CRC mainly arises through the Chromosomal Instability (CIN) pathway, but as the age-of-onset increases the two other main carcinogenic pathways, Microsatellite Instability (MSI) and CpG Islands Methylator Phenotype (CIMP), plays increasingly important roles in its development [2]. Moreover, these three main carcinogenic pathways (CIN, MSI and CIMP) vary according to tumor location, and several studies demonstrate that right colon, left colon and rectal cancers show genetic and molecular differences with divergent underlying carcinogenic mechanisms and risk factors [3, 4].

Recent studies have also established clinical, genetic and biological differences according to the age-of-onset of CRC, suggesting that it should be a major criterion for subclassifying CRC [5, 6]. Besides, we were able to differentiate two entities within CRC, as early-onset CRC (EOCRC) and late-onset CRC (LOCRC), with variable cut-points in the literature (45 or 50 years old for EOCRC; 70 or 80 years old for LOCRC), being ours 45 and 70, respectively [6]. LOCRC shows an important increase of epigenetic alterations, together with a higher susceptibility for carcinogenesis and a higher global mortality, due to comorbidities and less use of adjuvant treatments in this age group [7]. Nevertheless, it is a group that represents a high proportion within CRC and, as expected, it shares many features with sporadic cases.

To date, there are few studies on CRC that focused specifically on LOCRC and its characteristics, pointing out the need to define clinicopathologic features and prognostic factor that should help to guide treatment decision-making of this subset of CRC. Moreover, apart from these distinct factors according to prognosis, some publications underline the fact that the late-onset criteria should not be used when discarding these patients for surgery, improving prognosis for LOCRC patients in most cases [8].

Our group and others have previously defined particular features linked to tumor location in CRC [3, 9, 10]. In the present study, we want to apply those same criteria to LOCRC, to examine if tumor location also serves to categorize this subtype better. If so, this will provide a rationale for investigating possible molecular basis for carcinogenesis specific for each of the locations, and thus help to advance the clinical management of this subset of CRC.

RESULTS

Global group features

Clinicopathological and familial features

Clinical and molecular features of global LOCRC have been published before [6] and are shown in Table 1. According to the tumor location, right colon and rectum lead (39 and 38%, respectively). The remarkable features are the low rate of poor differentiated tumors (4%), but on the other hand, the considerable rate of mucinous component (29%). The higher stage at diagnosis was B (49%), with an outstanding rate of associated polyps through follow-up (64%), mainly adenomatous (61%). Familial component was low, being most cases sporadic (80%).

Molecular features

Molecular global group features have been published before [6, 30, 28], and summarized in Table 2. Only 9% of cases appeared MSI, mainly associated with *BRAP* mutations. From 90 cases studied for CIMP, the main group appeared was CIMP-H (49%), and the CIMP-High subgroup was related with the sporadic MSI cases previously described.

A total of 86 samples could be adequately processed for Array Comparative Genomic Hybridization (a-CGH) [30]. The results appeared previously as well, and the most interesting point that should be underlined was that there was no CNA greater or equal to 50% in this group, being the most recurrent alterations: losses at 5q13 and 14q11, and gains at 7q11, 7q21-q22, 19p13-q12, 19q13 and 20p11-q11.

Finally, both pathogenic mutations and variants of uncertain (or unknown) significance identified by Next Generation Sequencing (NGS) are listed in Supplementary Table 1. Most frequent mutations are those appearing in *KRAS*, *APC* and *p53*, and less frequently in *PIK3CA* (38%, 50%, 45% and 19%, respectively) (Figures 1 and 2, Supplementary Figures 1 and 2); others did not reach the 10%.

Comparative analysis according to tumor location

Clinicopathological and familial features

All these comparative features related with the three main tumor locations are summarized in Table 1, being those showing statistical significance described as follows. Comparatively, Right colon cancers were more frequent in females (65.8%), displaying an important proportion of mucinous component (34%). Left colon cancers were younger at age-of-onset (74.86 years-old), with better prognosis, and higher mean number of associated polyps (5.4). Another interesting aspect of this group was the

www.oncotarget.com 15303 Oncotarget

Table 1: Morphological and clinical description of CRC in LOCRC according to tumor location

	Right Colon n (%)	Left Colon n (%)	Rectum n (%)	P (χ ²)
Patients	97 (100)	38 (99.2)	22 (22.7)	37 (38.1)
Mean Age at Onset (Years, SD)	77.92 (5.73)	79.08 (6.01)	74.86 (5.36)	0.015
Gender				
Male	58 (51.5)	13 (34.2)	14 (63.6)	23 (82.2)
Female	47 (48.5)	25 (65.8)	8 (36.4)	14 (37.8)
Grade of differentiation:				
Well	21.80 (23.3)	10.35 (26.6)	5.22 (22.7)	6.73 (18.2)
Medium	65.90 (72.2)	22.35 (62.9)	17.22 (77.3)	26.53 (78.8)
Poor	4.90 (4.4)	3.35 (8.6)	0.22 (0)	1.03 (3)
Mucoccretion	18.91 (19.8)	12.35 (34.3)	2.22 (9.1)	4.54 (11.8)
Superficial Cells	2.91 (2.3)	0.92 (0)	0.22 (0)	2.94 (5.9)
Stage (UICC):				
I	5 (5.3)	2 (5.3)	1 (4.5)	2 (5.6)
II	46 (48.9)	22 (57.9)	8 (36.4)	18 (50)
III	24 (25.5)	8 (21)	10 (45.5)	6 (16.7)
IV	19 (20.2)	6 (15.8)	3 (13.6)	10 (27.8)
Global Survival (months, SD)	69.83 (11.23)	45.94 (4.50)	96.95 (10.26)	31.67 (3.87)
Survival (months, SD)				
21.68 (22.33)	20.16 (14.49)	31.68 (34.91)	16.25 (14.48)	NS
Associated Polyps	62.97 (63.9)	24.38 (63.2)	13.22 (59.1)	25.97 (67.6)
Mean number (SD)	2.70 (4.67)	1.78 (2.17)	5.40 (7.67)	2.0 (3.52)
Type:				
Adenomatous	38.02 (61.3)	13.24 (34.2)	7.13 (33.8)	18.25 (72)
Hyperplastic	6.62 (9.7)	3.24 (12.3)	0.13 (0)	3.25 (12)
Mixed	18.62 (29)	8.24 (33.3)	6.13 (46.2)	4.25 (16)
Multiple Primary Neoplasms	33.97 (34)	15.38 (39.5)	9.22 (40.9)	9.37 (24.3)
Synchronous and/or Metastatic CRC	21.97 (21.6)	9.38 (23.7)	8.22 (36.4)	4.97 (10.8)
Familial history of Cancer				
American II	1.97 (1)	1.38 (2.7)	0.22 (0)	0.37 (0)
LS neoplasms	12.97 (12.4)	6.38 (15.8)	6.22 (27.3)	0.37 (0)
Non-LS neoplasms	6.97 (6.2)	1.38 (2.7)	2.22 (9.1)	3.97 (8.1)
Sporadic	79.97 (80.4)	28.78 (73.7)	12.22 (55.5)	34.77 (91.9)

Abbreviations: LOCRC: Late-onset Colorectal Cancer; CRC: Colorectal Cancer; SD: Standard Deviation; LS: Lynch Syndrome.

substantial amount of familial cancer component, mainly linked with LS-related neoplasms (27%). Finally, rectal cancers showed sporadic phenotype according to familial cancer history, with worse prognosis. Free Disease Survival (FDS) was minor for rectal locations (Mean: 16.25 months, compared with left colon cancer, 31.68) ($p = 0.059$), as well as the Overall Survival (OS) (mean: 31.67 months, compared with left colon cancer, 31.68 months) ($p = 0.024$). Seventy-five percent of deaths were colorectal cancer-related deaths, mainly due to rectal cancers (52.38%).

www.oncotarget.com 15304 Oncotarget

Molecular features

Everything related with molecular features are described in Table 2. As we have mentioned before, nine cases showed MSI (9.3%), with only one of them due to a MMR-gene inactivation. In fact, seven of the others due to *BRAP* mutations and/or Hypermethylation of *MLH1* promoter, most of which were in the Right colon ($p = 0.023$). CIMP-High tumors reached only 24%, with an important amount of them mainly located at the rectum. According to the molecular classification, the most frequent category was MSI-CIMP-Low-0, reaching almost 86% of all Left colon cancers. Interestingly, another important one was MSI-CIMP-High within rectal tumors, with a 36% ($p = 0.002$).

According to the CIN, the location with the largest was right colon, not only talking about Genomic Instability Index (GI), but also in Copy Number Variations (CNV) per cases (data not shown). Meanwhile, left colon cancers show an interesting low Chromosomal Instability (CI), and rectal tumors manifested as an intermediate location, excluding the high mean of whole altered chromosomes. Differences did not show statistical significance maybe due to the intrinsic CIN shown already associated to the age.

Minimum recurrently lost or gained regions at the different locations are shown in Supplementary Table 2. Moreover, those most frequent altered chromosomal regions for the three cancer locations and the cumulative cancer genes codified within are listed in Supplementary Tables 3, 4 and 5. Recurrent gains and losses were more slightly frequent in right-sided LOCRCs, followed by rectal cases. The only recurrent regions that were observed in all three tumor locations were gains of 7q11.23-11.23, and 20q11.1-q11.23. Four regions were common to right- and left-sided LOCRCs: losses at 18q12.1-12.2, 18q21.1 and 18q22.1-23, and gains at 7q21.1. Only two were common to left-sided and rectal LOCRCs: losses at 5p15.33-15.33 and alterations in 1q21.1-21.2. Finally, a high proportion of altered regions were common between right colon and rectal cancers. Individually, the most frequent altered regions for each location were: gains at 7q11.21 and 7q11.23 and losses at 18q22.1-22.3 in right-

sided LOCRCs; losses at 18q11.21-11.23 in left-sided LOCRCs; and gains at 7q11.22-11.23 in rectal LOCRCs.

Talking about pathogenic mutations, only *KRAS* and *PIK3CA* showed statistical differences (Supplementary Table 1). *KRAS* appeared scarcely in left colon cancer (29%), while right colon and rectum showed more than 70% and 60%, respectively; and *PIK3CA* showed a decreasing progression from right colon to rectum (33%, 14% and 9%) (Figures 1 and 2).

DISCUSSION

CRC is a heterogeneous disease with different outcomes and drug responses. Subclassification according to age of onset and tumor location could have implications in terms of diagnosis, prevention and therapy. LOCRC appeared as an important proportion of CRC that is why should be a subset in which focused on. In the general group, without applying location criteria, we found some already-known features, as could be the association with polyp's development during the follow-up, and the sporadic forms predominance. Looking for the main molecular pathways, the low rate of MSI cases, due mainly to sporadic forms, in an intimate relation with CIMP-High have been already published before [11]. The absence of a predominant altered region within the a-CGH analysis, all of which do not reach a 50%, talk about the possible heterogeneity of this group of age. Some of them have been already related with CRC, but in studies without age-of-onset criteria, as loss of 5q13 [11] or alterations in 7q21, associated with no-responder to neoadjuvant therapy for rectal cancer [13].

As we have mentioned before, we have recently published the differential features for EOCRC according to the tumor location, appearing some interesting subsets within this age-of-onset [3]. In relation with LOCRC, some differences have also emerged. As expected, Right colon cancers fulfilled those features associated with sporadic MSI-CRC [14]. Predominance of female cases and *BRAP* mutations, with an important amount of mucinous component, although, surprisingly, CIMP-High appeared more in rectal cases. While Left colon cancers developed

Figure 1: Lollipop plot for KRAS mutations according to the tumor location.

www.oncotarget.com 15305 Oncotarget

Table 2: Molecular features of LOCRC according to tumor location

	Left-orectal CRC n (%)	Right Colon n (%)	Left Colon n (%)	Rectum n (%)	p (χ ²)
MSI	597 (9.3)	738 (18.4)	222 (9.1)	037 (0)	0.023
MMR genes mutation	197 (1)	128 (2.6)	022 (0)	037 (0)	NS
BRAP mutation	797 (2.2)	538 (13.2)	122 (4.5)	137 (2.7)	NS
CIMP^a					
CIMP-0	4490 (48.9)	1736 (47.2)	1421 (66.7)	1333 (39.4)	NS
CIMP-Low	2490 (26.7)	1236 (33.3)	321 (19)	833 (24.2)	
CIMP-High	2290 (24.4)	736 (19.4)	321 (14.3)	1233 (36.4)	
Molecular Classification					0.002
MSI-CIMP-High	790 (7.8)	536 (13.9)	221 (9.5)	033 (0)	
MSI-CIMP-Low-0	290 (2.2)	236 (5.6)	021 (0)	033 (0)	
MSI-CIMP-High	1590 (16.7)	236 (5.6)	121 (4.8)	1233 (36.4)	
MSI-CIMP-Low-0	6690 (73.3)	2736 (75)	1821 (85.7)	2133 (63.6)	
GENOMIC INSTABILITY^b					
GII					
Gains	0.147055	0.183649	0.101056	0.133332	NS
Losses	0.200192	0.249820	0.114539	0.194276	
Normal	0.652745	0.566522	0.784362	0.672383	
Mean of whole altered chromosomes	3.36	3	1.39	3.76	NS

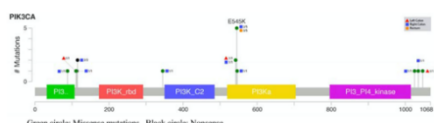
^a Ninety cases were analyzed for the global group.^b Eighty-six cases were analyzed for the global group.

Abbreviations: LOCRC: Late-onset Colorectal Cancer; MSI: Microsatellite Instability; MMR: Mismatch Repair genes; MSS: Microsatellite Stability; GII: Genomic Instability Index; SD: Standard Deviation.

a higher number of polyps and synchronous and/or metachronous (SCRCs and/or MCRCs), with a familial cancer component, and better prognosis, maybe related with the high number of polyps' development, and a more severe follow-up. Rectal cancers show a predominantly sporadic phenotype, with worse prognosis.

Also, it is important to underline the fact of the higher CIN of the Right colon group, in contrast with what is published, a low CIN due to the MSI component in this location, taking without any age-criterion [15].

This aspect is linked with one interesting point related with the most frequent altered chromosomal segments within LOCRC population, and for every tumor location. Most of them, showed in Supplementary Table 2, are related with some of the identified Common Fragile Sites (FRA) and suggests that these are hotspots of genomic instability leading to inactivation of genes encoded within them, or that as FRA are functional units and that loss of the encoded genes confers selective pressure, leading to cancer development [16]; e.g. the most frequent and

**Figure 2: Lollipop plot for PIK3CA mutations according to the tumor location.**

www.oncotarget.com

15306

Oncotarget

shared chromosomal segments by the three colon locations comprises FRA 7B and FRA 20A [17, 18]. This may be in relation with the instability component associated with aging exhibited by this subgroup of tumors. Unexpectedly, Left-sided colon cancer appeared as those with the lowest CIN between the three locations. Some other frequent alterations within LOCRC have been already associated with CRC: Gains in 7q11.21, frequent in our right colon LOCRC, have been associated with LS cases as a whole [19]. Moreover, frequent also in Right colon locations were losses at 18q21.1-22.3, a region whose alteration may be useful as a predictor of benefit from adjuvant fluorouracil therapy [20]. Another, an alteration in 18q21.1, common between right and left colon cancers, has been already connected with a higher risk of CRC [21]. Finally, in one region frequently gained in the three locations, 20q11.1-1.23, is located SRC, a proto-oncogene whose variation determines progression in CRC [22].

Most frequent mutations appeared in KRAS, APC and p53, and less frequently in PIK3CA, but only the first one overreaching the 50%. A recent study published by Shimada et al. [23], analyzed differences between CRC without age-of-onset criterion, according to the tumor location, and within these, studied pathogenic mutations in main genes. They got higher proportions of gene mutations, blurring with our results. Nevertheless, although they did not detect rectal from left colon cancers in the comparative analysis, differences in PIK3CA and KRAS are correlative with ours, except the high proportion of KRAS also seen in rectal location within our population. Other genes, however, did not show differences, compared with the results published by Shimada et al. [23], showing APC and p53 higher rates in right colon cancers, within others. This apparent less importance of pathogenic mutations in most frequent genes, compared with CIN, may be due, between others, to a more important role of this last carcinogenic pathway in LOCRC, more illustrated by right colon location.

All these findings suggest the importance and, in some manner, the need of categorize LOCRC, as we confirmed within EOCCR, according to the tumor location. Not only because phenotypical differences appear from clinical and familial point of views. In the same way that the molecular basis of sporadic MSI cases stays all together in Right-colon category, some specific CNA for each location could be useful as a starting point for future approaches in order to find out specific molecular alterations within the heterogeneous group of CRCs, as LOCRC is.

MATERIALS AND METHODS

Families, samples and data collection

A total of 100 consecutive individuals with CRC diagnosed at an age of 70 years or older were collected from our institution, starting from January 2002, excluding

www.oncotarget.com

15307

Oncotarget

3 due to the diagnosis of FAP. They were considered the index case of each family. All patients, or a first degree relative in case of death of the index case, provided written consent. Personal and clinicopathologic information was obtained including age of onset, gender, location of the CRC (right/left colon or rectum), grade of cell differentiation (low, medium or high), mucin production, the presence of "signet ring" cells, modified Asker-Collier signs, the existence of polyps during follow-up, type of polyps (adenomatous, hyperplastic and mixed), the presence of SCRCs or MCRCs, and the presence of primary multiple neoplasms in the index case.

To analyze the antecedents of cancer, families were classified into four groups: a) families fulfilling the Amsterdam II criteria for LS [10]; b) families with mainly aggregation -one in first-degree or two in second-degree family members- of LS-related neoplasms; c) families with mainly aggregation of LS-unrelated neoplasms; d) cases without oncological antecedents; these were considered sporadic cases.

Follow-up was at least 5 years from surgery, defining FD and OS, recurrence and cancer-related death for each case.

Microsatellite instability and mutational analysis

MSI analysis was performed using the Bethesda panel [24, 25]. The five microsatellite markers were PCR amplified, and fluorescently labeled fragments were evaluated using a 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); data were analyzed using GeneMapper software version 3.5 (Applied Biosystems). Tumors were considered as MSI when showing high-frequency MSI (MSI-H) (two or more of the five markers showing instability), while the rest were classified as MSS. MSI cases were screened for germline mutations in the MMR genes MLH1, MSH2 and MSH6 by denaturing gradient gel electrophoresis using a DGCole system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), by denaturing high performance liquid chromatography using a Varian ProStar system (Varian Australia Pty Ltd, Melbourne, Australia), or by high-resolution melting analysis using a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche, Mannheim, Germany). Primers and denaturing and melting conditions were as previously reported, with slight modifications [26]. When an anomalous band or pattern was observed by denaturing gradient gel electrophoresis, denaturing high-performance liquid chromatography, or high-resolution melting, the PCR product of the fragment was sequenced using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and was analyzed using an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems). MSI sporadic cases were identified by determining the methylation status of the MLH1 gene promoter and/or determination of BRAF mutational status. Methods carried out were described in previous publications [6].

www.oncotarget.com

15307

Oncotarget

Analysis of CpG island methylation phenotype panel

Methylation status of promoter regions of the CIMP panel genes: CACNA1G, CDKN2A, CREBB1, RFX5, MLH1, NR2F1, RFX5 and RFX5 were analyzed by means of methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification using the SALSA MLPA kit (M0242-B1; MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) following the manufacturer's recommended procedure. The methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification products were resolved by capillary electrophoresis using a 3100-Avant genetic analyzer, and peaks were analyzed using GeneMapper software version 3.5. The methylation index of a specific CpG locus was calculated by dividing the normalized area of a given HhaI-digested probe sample and the undigested equivalent. CIMP-High was defined as the presence of ≥ 5/8 methylated promoters, CIMP-Low as 1/8 to 5/8 methylated promoters, and CIMP-0 as the absence (0/8) of methylated promoters.

Molecular classification

According to the MSI and CIMP status, we classified both groups (early-onset and elderly CRC) into four categories, because differences between MSI-L and MSS are subtle and differences between CIMP-Low and CIMP-0 are also subtle: MSI-CIMP-High; (MSS-CIMP-Low-0); (MSS-CIMP-High); (MSS-CIMP-Low-0) [27].

Chromosomal instability: array comparative genomic hybridization (aCGH)

aCGH was performed using NimbleGen oligonucleotide microarrays (Roche NimbleGen, Inc., Redwood City, CA) in order to identify CNAs, and has been described before. The degree of genomic instability has been already described, as well, in the same work [28], and have been included in the Gene Expression Omnibus (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Correlative cancer codes within those most frequent altered chromosomal regions for the three cancer locations are shown in corresponding tables [29].

Next generation sequencing (NGS)

Ion torrent PGM library preparation

An Ion Torrent adapter-ligated library was generated using the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 and the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel version 2 (Thermo Fisher Scientific, Rev. B.0; MAN000715). Briefly, 2 µL of 5X Ion AmpliSeqTM HIFI mix, 2 µL of 5X Ion AmpliSeqTM Primer Pool and 5 ng of gDNA per reaction were mixed together and amplified following the temperature conditions provided by the manufacturer. Then, primer sequences were partially digested by adding

1 µL of PfuPa Reagent and loaded in a thermal cycler under the conditions detailed in the user guide. Finally, each library was marked with a unique adapter provided in Ion AmpliSeqTM barcode adapters 1-96 K (Life Technologies) in a reaction mixture containing 2 µL of Switch Solution, 1 µL of diluted barcode and 1 µL of DNA ligase, also under the temperature conditions provided by the manufacturer. After AMPure bead (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) purification, the concentration of the library (in a 100-fold dilution) was determined using the Ion Library TaqMan quantitation assay kit (Thermo Fisher Scientific) in a 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Each sample was run in a minimum of two replicates.

Emulsion PCR

Sample emulsion PCR and enrichment were performed using the Ion PGMTM Template OT2 200 Kit and Ion One TouchTM 2 System (Life Technologies). We followed the manufacturer's instructions except for the concentration of the pooled libraries which in this work was set at 9nM.

Sequencing on the Ion torrent PGM platform

All barcoded samples were sequenced using the Ion PGMTM Hi-QTM Sequencing Kit (Life Technologies) in an Ion Torrent PGM instrument (Life Technologies) with Ion 318TM v2 chips (Life Technologies).

Chip loading procedure was performed according to the user guide for the Ion PGMTM Hi-QTM Sequencing Kit (Life Technologies). A maximum of 15 samples were loaded on a single chip per sequencing run.

Bioinformatics processing and data analysis

Base calling and alignment to the human genome (hg19) were executed with the Torrent Suite Software v4.0 using the variant caller plugin. Variants were annotated using Ion Reporter and each mutation was verified in the Integrative genome viewer (IGV) from the Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/igv/) [30].

Statistical analyses

Continuous variables were expressed as mean values plus/minus standard deviation (SD), and categorical variables were expressed as number of cases and their percentage. Differences were considered significant when $p < 0.05$. For association between colon location and other discrete variables, statistical analyses were performed using Pearson's Chi Square (χ^2) Test for parametric variables, and Fisher's Exact Test for non-parametric variables. When those features were continuous variables, Student's t test was used. Survival analyses were also carried out by Kaplan-Meier test. The SPSS v15.1 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) statistical package was used. For the aCGH analysis, statistics were as follows: For identifying significant minimum regions, both univariate

and multivariate analysis were carried out. Regarding the univariate analysis, unconditional logistic regression was carried out for each candidate region. For the multivariate analysis, each of the regions was tested separately, including other relevant clinical variables. Location was considered as a factor in all the analysis carried out. This analysis was performed in R Statistics Software [31].

Abbreviations

RC, colorectal cancer; LOCRC, late-onset colorectal cancer; EOCCR, early-onset colorectal cancer; CIMP, CpG island methylation phenotype; CNA, copy number alterations; FAP, familial adenomatous polyposis; LS, Lynch syndrome; CIN, chromosomal instability; MSI, microsatellite instability; aCGH, array comparative genomic hybridization; NGS, next generation sequencing; FDS, free disease survival; OS, overall survival; MMR, mismatch repair genes; MSS, microsatellite stability; CNY, copy number variations; CI, chromosomal instability; SCRC, synchronous colorectal cancer; MCRC, metachronous colorectal cancer; IGV, integrative genome viewer; SD, standard deviation; GI, genomic instability index.

Author contributions

Conception and design: José Perex, Lorena Brandtitz, Juan L. García, Damia Garcia-Olmo, Miguel Urioste, Rogelio González-Sarmiento. Provision of study materials or patients: Lorena Brandtitz, Juan M. Cano, José Perex, Jessica Pérez, Daniel Rueda, Eduardo Rubio, María Arriba, Yolanda Rodríguez, Carmen Sánchez, Alfredo Vivas, Miguel Urioste, Rogelio González-Sarmiento. Laboratory analysis: Juan L. García, María Arriba, Daniel Rueda, Sandra Tapia, Laura Peña, Mariano García-Arriaza. Collection and assembly of data: José Perex, Juan L. García, Jessica Pérez, Rogelio González-Sarmiento. Data analysis and interpretation: Lorena Brandtitz, José Perex, Juan L. García, Rogelio González-Sarmiento. Manuscript writing: Lorena Brandtitz, José Perex, Damia Garcia-Olmo, Miguel Urioste, Rogelio González-Sarmiento. Final approval of manuscript: All authors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Tumor Registry of the Pathology Department of the 12 de Octubre University Hospital, for providing us with paraffin-embedded tumors, and Ron Hartwig for his help with the English revision of this article.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest to declare.

www.oncotarget.com

15309

Oncotarget

- type APC predicts poor prognosis in microsatellite-unstable proximal colon cancer. *Br J Cancer*. 2015; 113:979-88. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.296>.
10. Pérez J, Arriba M, Rueda D, Sánchez R, García JL, Pérez J, Rodríguez Y, González-Sarmiento R, Ustio M. Comment on: Wild-type APC prediction of poor prognosis in microsatellite-unstable proximal colorectal cancer differs according to the age of onset. *Br J Cancer* 2016; 114:e7.
 11. Jao JR, Young J, Leggett BA. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum. *Histopathology*. 2000; 37:295-301. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.01028.x>.
 12. Dyrer T, Li J, Wang K, Lindberg J, Kober S, Bolund L, Jakobsen A, Bruun-Petersen G, Li S, Criger DG. Identification of chromosome aberrations in sporadic microsatellite stable and unstable colorectal cancers using array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet*. 2011; 204:84-95. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2010.08.019>.
 13. Molteni C, Ballardini M, Teodorani N, Giannini M, Zili W, Emiliani E, Lucii F, Passari A, Rosetti F, Sangani L, Guidoboni M, Amadori D, Calini D. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol*. 2011; 6:161. <https://doi.org/10.1186/1745-7754-6-161>.
 14. Corso G, Pascale V, Flati G, Ferrara F, Marelli D, Rovello F. Oncogenic mutations and microsatellite instability phenotype specific mutational subsets in colorectal cancer. *Eur J Hum Genet*. 2013; 21:1383-88. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.66>.
 15. de la Chapelle A, Hangel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28:3380-87. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.0652>.
 16. Hazan I, Hofmann TG, Aguilera RI. Tumor Suppressor Genes within Common Fragile Sites Are Active Players in the DNA Damage Response. *PLoS Genet*. 2016; 12:e1006436. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006436>.
 17. Basso N, Pellicci F, Rocchi A. Characterization of FRA7B, a human common fragile site mapped at the Ty chromosome terminal region. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2010; 202:47-52.
 18. Marnett K, Scholer C, Tschann A, Bala R, Frazee B, Willison K, Blumrick N, Claassen U, Lohr T, Weiss A. Global screening and extended nomenclature for 220 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int J Oncol*. 2010; 36:929-40.
 19. Tallent-Palmer BM, Holliday EG, Evans TJ, McElroy M, Attia J, Greer DM, Masson AL, Midlrum C, Spiggman A, Scott BJ. Continuing difficulties in interpreting CNV data: lessons from a genome-wide CNV association study of Australian HNPCC/lymph syndrome patients. *BMC Med Genomics*. 2013; 6:10. <https://doi.org/10.1186/1755-794-6-10>.
 20. Barrett PL, Seymour MT, Stenning SP, Georgiades I, Walker C, Bibeck K, Quake F and UKCCCR AXIS trial collaborators. Adjuvant X-ray and Fluorouracil Infusant Study: DNA markers predicting benefit from adjuvant fluorouracil in patients with colon cancer: a molecular study. *Lancet*. 2002; 360:1381-91. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11402-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11402-4).
 21. Baert-Dumont S, Chabonnier F, Huetel E, Ippolito L, Maillon J, Bougnard M, Abadie C, Meka D, Daffier J, Desseigne F, Colas C, Pajot P, Lajouze S, et al. Clinical relevance of 8q23, 15q13 and 18q21 SNP genotyping to evaluate colorectal cancer risk. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24:99-105. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.72>.
 22. Windham TC, Parkh NU, Siwak DR, Summy JM, McCoskey DJ, Kinker AJ, Guller GE. Src activation regulates anoxia in human colon tumor cell lines. *Oncogene*. 2002; 21:7797-807. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205989>.
 23. Shimada Y, Kameyama H, Nagakashi M, Ichikawa H, Manooka Y, Yagi R, Tajima Y, Okumura T, Nakano M, Sakai J, Katsuyoshi T, Nigami H, Maruyama S, et al. Comprehensive genomic sequencing detects important genetic differences between right-sided and left-sided colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8:9357-93579. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20510>.
 24. Roland CH, Thibodeau SN, Hamblin SR, Sidransky D, Fakhreian JR, Burt RW, Muthus S, Rodriguez-Silga MA, Fodde R, Ranzani CN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998; 58:5248-57.
 25. Perez J, Alvarez I, Rodriguez Y, Gonzalez C, Sanchez-Tand E, Rivera B, Collina F, Carbonell F, Gonzalez-Sarmiento R, Hidalgo M. Ustio M. Approach to early-onset colorectal cancer: clinicopathological, familial, molecular and immunohistochemical characteristics. *World J Gastroenterol*. 2010; 16:3697-703. <https://doi.org/10.3748/wjg.16.3697>.
 26. Perez J, Rodriguez Y, Rueda D, Marin JC, Diaz-Tuande J, Alvarez E, Alegre C, Oustio R, Collina F, Lomas M, Hidalgo M, Benítez J, Ustio M. Early-onset colorectal cancer is an easy and effective tool to identify retrospectively Lynch syndrome. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18:3285-91. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1782-4>.
 27. Ogino S, Nishio K, Kikuchi GI, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, Giovannucci EL, Fuchs CS. CpG island methylation phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009; 58:90-96. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.155473>.
 28. Arriba M, García JL, Ingels-Pérez L, Rueda D, Oustio I, Rodríguez Y, Álvarez E, Sánchez R, Fernández T, Pérez J, Hernández JM, Benítez J, González-Sarmiento R, et al. DNA copy number profiling reveals different patterns of chromosomal instability within colorectal cancer according to the age of onset. *Mol Carcinog*. 2016; 55:705-16. <https://doi.org/10.1002/mc.22315>.
 29. An O, Dall'Olio GM, Mouskias TP, Ciccarelli FD. NCG 5.0: updates of a manually curated repository of cancer genes and associated properties from cancer mutational screenings. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44:D992-99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1123>.
 30. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013; 14:178-92. <https://doi.org/10.1093/bib/bbt017>.
 31. R Core Team. R Foundation for Statistical Computing. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria; 2012.

www.oncotarget.com

15310

Oncotarget

www.oncotarget.com

15311

Oncotarget

ANEXO 4. Clinical and molecular comparative study of colorectal cancer based on age-of-onset and tumor location: two main criteria for subclassifying colorectal cancer (Álvaro E *et al.*; 2019)

Clinical and Molecular Comparative Study of Colorectal Cancer Based on Age-of-Onset and Tumor Location: Two Main Criteria for Subclassifying Colorectal Cancer

Edurne Álvaro ^{1,*}, Juana M. Cano ^{2,*}, Juan L. García ³, Lorena Brandáriz ^{4,5},
Susana Olmedillas-López ^{5,6}, María Arriba ^{7,8}, Daniel Rueda ^{7,8,9}, Yolanda Rodríguez ^{9,10},
Ángel Cañete ¹⁰, Julia Arribas ¹⁰, Lucía Inglada-Pérez ¹¹, Jessica Pérez ³, Carlos Gómez ¹²,
Mariano García-Arraz ⁵, Damián García-Olmo ^{4,5,*}, Ajay Goel ^{13,*}, Miguel Urioste ^{11,14,*},
Rogelio González-Sarmiento ^{3,*} and José Perea ^{4,5,*}

- 2 Surgery Department, "Infanta Leonor" University Hospital, 28001 Madrid, Spain; cas.lobos@hmgibj.com
- 3 Oncology Department, Ciudad Real General Hospital, 13005 Ciudad Real, Spain; jaramanarica@salamanca.es
- 4 Molecular Medicine Department, Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca-SACYL-CSC, 37007 Salamanca, Spain; jgarciaibsa@usal.es (J.G.); jorge@ibsa@usal.es (J.F.)
- 5 "Federación Jímenez Díaz" University Hospital, 28040 Madrid, Spain; leonor.bondar@hmgibj.com
- 6 Health Research Institute-Fundación Jiménez Díaz University Hospital, 28040 Madrid, Spain; rosalia.oliveros@hmgibj.es (R.O.); mariano.garcia@hmgibj.es (M.G.-A.)
- 7 Biochemistry Department, Gregorio Marañón University Hospital, 28007 Madrid, Spain; arbdoncas@hmgibj.com
- 8 Molecular Biology Laboratory, University Hospital "12 de Octubre", 28041 Madrid, Spain; raulandrade@regiorgibj.com
- 9 Digestive Cancer Group, "12 de Octubre" Research Institute, 28041 Madrid, Spain; Pathology Department, University Hospital "12 de Octubre", 28041 Madrid, Spain; yelalandrade@regiorgibj.com
- 10 Gastroenterology Department, University Hospital "12 de Octubre", 28041 Madrid, Spain; steve.angel@hmgibj.com (S.A.); carla.garcia@hmgibj.com (C.G.)
- 11 Center for Biomedical Networks Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain; ingelindagarcia.es
- 12 Gastroenterology Department, University Hospital "12 de Octubre", 28041 Madrid, Spain; cecilia.zamorano@regiorgibj.com
- 13 Center for Gastrointestinal Research, Center for Translational Genomics and Genomics Research, Spanish Research Institute, Charles A. Sammons Cancer Center, Baylor University Medical Center, Dallas, TX, USA
- 14 Familial Cancer Clinical Unit, Spanish National Cancer Center (CNIO), 28009 Madrid, Spain; Correspondence: damian.gutierrez@cnio.es (D.-C.); jorge@cniohealth.org (J.G.); moris@cniohealth.org (M.); carla.garcia@cniohealth.org (C.G.)
- 15 These authors contributed equally to this work.

Received: 17 December 2018; Accepted: 19 February 2019; Published: 22 February 2019

Abstract: Our aim was to characterize and validate that the location and age of onset of the tumor are both important criteria to classify colorectal cancer (CRC). We analyzed clinical and molecular characteristics of early-onset CRC (EOCRC) and late-onset CRC (LOCRC), and we compared each tumor location between both ages-of-onset. In right-sided colon tumors, early-onset cases showed extensive Lynch syndrome (LS) features, with a relatively low frequency of chromosomal instability (CIN), but a high CpG island methylation phenotype. Nevertheless, late-onset cases showed predominantly sporadic features and microsatellite instability cases due to BRAF mutations. In left colon cancers, the most reliable clinical features were the tendency to develop polyps as well as

Int. J. Mol. Sci. **2019**, *20*, 968; doi:10.3390/ijms20040968

www.mdpi.com/journal/ijms

multiple primary CRC associated with the late-onset subset. Apart from the higher degree of CIN in left-sided early-onset cancers, differential copy number alterations were also observed. Differences among rectal cancers showed that early-onset rectal cancers were diagnosed at later stages, had less association with polyps, and more than half of them were associated with a familial LS component. Stratifying CRC according to both location and age-of-onset criteria is meaningful, not only because it correlates the resulting categories with certain molecular bases, but with the confirmation across larger studies, new therapeutic algorithms could be defined according to this subclassification.

Keywords: early-onset colorectal cancer; late-onset colorectal cancer; microsatellite instability; chromosomal instability; CpG island methylator phenotype; tumor location.

1. Introduction

In Europe, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in males, the second most common cancer in females, and the fourth most common cause of cancer-related deaths; worldwide, 1,360,000 new cases are diagnosed each year and it causes 700,000 deaths [1]. Biologically, it represents a heterogeneous disease. Early-onset colorectal cancer (EOCRC) represents 11% of colon cancers and 18% of rectal cancers, and its incidence is increasing [2]. Several studies have described different genetics, biological and clinical behavior in this age group, suggesting that it may be a specific subgroup within CRC, and that age-of-onset should be a major criterion for its subclassification [3,4]. Moreover, new findings may also define some particular subtypes, such as rectal cancer with microsatellite-stability (MSS) and without chromosomal instability (CIN-) [5].

The disposition of the three main carcinogenic CRC pathways to different locations in the colon, together with studies demonstrating that right and left-sided CRCs exhibit different genetic, biological and demographic characteristics and risk factors, suggest that the carcinogenic mechanism and progression of CRC may differ with tumor location. Thus, the anatomic site of origin of CRC appears to be another good discriminator for the subclassification of this type of neoplasm [6–8]. Along these lines, we recently analyzed tumor location (right colon, left colon and rectum) as a discriminatory factor within EOCCR and clinical differences emerged as well as the different main carcinogenic pathways predominant within each location [9].

For the past few years, while characterizing BIOCRC from different points of view, we have been comparing series of features with their correlates in late-onset CRC (LOCRC) in order to assess whether they have a different molecular basis [3,4,10]. Therefore, our purpose at this point is to confirm whether our previous findings that the differential clinical and molecular features of tumors with a different location in CRC and the age-of-onset as a major criterion to classify CRC, hold up together. If so, right colon, left colon and rectal cancers should be substantially different between early and late age-of-onset groups.

2. Results

2.1. EOCRC: Global Group Features and Comparative Analysis According to Colon Location

2.1.1. Clinicopathological and Familial Features

Comparative analysis of EOCRC with respect to tumor location has been published before [9]. Left colon was the most frequent location (43%), followed by rectum (33%). The main features for each location are shown in Tables 1–3.

n/N	EARLY-ONSET	n/N
-----	-------------	-----

[illegible]Cancer
Unicef
Hylation

4 of 38

Table 1. Comparison between right colon cancers with different ages of onset

[illegible]

factor;
when
labor

3 of 11

component, with more than 50% of cases with LS-related neoplasms in their families. Conversely, LOCC cases were mainly sporadic.

2.5.2. Molecular Features

All LOCCs were MSS, and an important number of these tumors showed CIMP-High (36%). More than 90% of EOCC were MSS-CIMP-High. Lastly, there were differences in relation to CIN, with the young rectal cancers displaying less instability for losses (Figure 1C and Table S1).

Although there were some differentially altered chromosomal segments between these age-of-onset groups, they were not as high in proportion as in other locations, with a slight predominance for LOCC (Table 4 and Table S1). In this last group losses in 1p36.32-36.13 and gains in 5q13.2 are the most frequent.

Table 4. Summary of the main specific differential chromosomal regions between each age-of-onset group, for each colon location.

Chromosomal Segment	RIGHT-SIDED COLON			LEFT-SIDED COLON			RECTUM		
	EO	LO	EO	LO	EO	LO	EO	LO	EO
chr1	455.242.2	0	81						
chr1	455.142.2	0	81						
chr2	459.2	0	81						
chr2	459.2	84	20						
chr10	412.121-11.22	79	23						
chr14	414.112.2	85	37						
chr16	413.23-23.1	84	11						
chr17	413.2	62	29						
chr18	413.23-23.1	0	84						
chr18	413.23-23.1	8	81						
chr7	411.23-11.1	15	43						
chr7	422.131-31.3	15	87						
chr7	412.12-11.1	15	84						
chr7	411.21	15	84						
chr9	412.13	0	81						
chr9	413.1	62	29						
chr9	414.12-14.13	62	29						
chr13	411	8	81						
chr21	422.3	62	26						
chr1	412-43.1		43	10					
chr5	413.142.2		47	16					
chr9	412-43.21		39	21					
chr9	413.23-23.1		42	16					
chr11	413.12-413.1		63	21					
chr11	413.12-413.1		59	29					
chr15	411.1413.2		0	26					
chr19	413.12-12		39	26					
chr1	413.2-36.13				5	41			
chr1	413.23-36.22				37	12			
chr1	413.13-11.1				42	32			
chr5	413.2				5	83			

EO: Early-onset; LO: Late-onset; Chr: chromosome; Green: gained regions; Red: lost regions. Percentages shown in bold indicate frequencies that are at least twice as high in one age-of-onset group as in the other.

3. Discussion

CRC is a heterogeneous disease with different outcomes and drug responses. Subclassification according to the age of onset and tumor location may have applications in terms of diagnosis, prevention and therapy. We recently published differential features for EOCC and LOCC separately, according to tumor location, and some interesting subsets within these age-of-onset groups became manifest [9,11]. More interesting, however, was the possibility that both factors, age of onset and colon location may differentiate CRC.

In right colon cancers, the differential phenotypes for both age groups are clearly correlated with their molecular basis. Right-sided early-onset cases showed important LS features (poorly differentiated tumors, a higher mean number of polyps, the familial component of LS-related neoplasms), all of which are likely to be associated with the 30% of MSI due to germline mutations in MMR genes; these tumors have a relatively low CIN but are CIMP-High. The late-onset subset was mainly present in females, with sporadic features, and only 18% of cases were MSI; this was seldom due to LS but mostly because of BRAF mutations. In spite of the higher CIN of right-sided LOCCs, the two most frequently occurring differential regions (1q21 and 10q11.21-11.22) were observed in early-onset cases. Increased alterations in 1q21 have been found before in EOCC, although the criterion of tumor location was not applied [13], while 10q11.21-11.22 is a region where the RET gene is located [14]. Another important aspect that should be underlined is the presence of losses in 14q11.1-11.2. Here the NDGR1 gene is located, a tumor suppressor gene that has been associated with c-MYC and the TGF- β pathway in colorectal carcinogenesis [15,16], and its epigenetic silencing promotes tumor proliferation and invasiveness [17].

Left-colon tumors showed predominantly differences according to CIN (mainly whole chromosomes shared). The most reliable clinical features were associated with the late-onset subgroup, showing an important tendency to develop polyps as well as Multiple Primary CRC, in contrast with the early-onset subgroup. Nevertheless, left-sided EOCCs showed the higher CIN, as well as some differential CNAs, few of which have been associated previously with other features of CRC or the early-onset of cancers. As we mentioned before, losses in 1q21-1-21.2 are found significantly more in EOCC [13]; losses in 11q14.1-14.3 have been associated with aggressive behaviors and familial linkage, albeit in prostate cancers [18]; gains in 19p13.12 may be related with NOTCH3 expression or function [19]. In addition, 11q14.1 harbors GAB2, a gene involved in Epithelial to Mesenchymal transition, and more importantly, in the development of lymph-nodes invasion and metastasis [20].

Differences within rectal cancers are more prominent in the early-onset subset: later-stages at diagnosis, less association with polyps, and more than half of them associated with a familial LS component, although all of them are MSS. Only the CIMP-High-MSS category (36%) within LOCC is noteworthy. Only a few differential chromosomal segments appeared at high rates, and the most frequent were associated with LOCC; one of these, gains in 5q13.2, involves a segment associated with rectal metastatic carcinomas [21].

Finally, we wanted to assess to which categories our location and age-of-onset subgroups corresponded when comparing them with the recent consensus molecular classification of the CRC subtyping consortium [22]. Since consensus molecular subtype 1 (CMS1 or MSI immune) is mainly located in the right colon, we compared both age groups. As CMS1 characterized by MSI, this is related to both age groups, but mainly with the right-sided early-onset subgroup. The other features are shared by the separate groups individually. While right-sided EOCC is linked with CIMP-High and a low prevalence of somatic CNAs or CIN, right-sided LOCC showed BRAF mutation, high grade of differentiation, predominance in females, and worse survival after relapse, in agreement with recent studies showing worse prognosis of patients with MSI and recurring BRAF-mutant CRC [23–25]. In our study, the location group within EOCC that had the best prognosis was the right colon, while for LOCC it was the left colon.

Consensus molecular subtype 2 (CMS2 or Canonical) is the most frequent and is defined by somatic copy number alterations (SCNAs) in a larger proportion than in the other subtypes, by being

mainly left-sided and by having a larger proportion of long-term survivors. Compared to our study, the first three characteristics are clearly connected with left-sided EOCC and only the last with right-sided LOCC.

Consensus molecular subtype 3 or metabolic type is characterized by MSI, CIMP-Low and low CNA. Some features are associated with EOCC (left colon with CIMP-low and MSI, and rectum also CIMP-low), and others with left-sided LOCC and LOCC, respectively (low CNA and CIMP-High).

Consensus molecular subtype 4 or mesenchymal type exhibits SCNA high, is diagnosed at more advanced stages and show worse relapse-free and overall survival. Rectal tumors mainly with early-onset could be classified in this molecular subtype. This point about rectal tumors deserves a separate consideration to the extent that CMS classification mainly focused on right versus left colon cancer, and only a few rectal cancers were included. The study of rectal cancer within EOCC may arise especially significant, as this subtype is the one that is increasing more remarkably in the last years [26,27]. Other important points to take into account are that it has the worse prognosis for both age-of-onset subgroups and that rectal cancer is a different disease than colon cancer [28]. Efforts are needed in order to identify with enough cases the group of the aforementioned classification where rectal cancer could be framed if a new category does not arise as a result of this analysis.

However, our results and their correlative implications should be considered cautiously given the limited sample size of the groups. Additional studies with a larger sample size should be developed to confirm our findings.

4. Materials and Methods

4.1. Families, Samples and Data Collection

Between January 2002 and December 2008, a total of 82 consecutive individuals with CRC diagnosed at an age of 45 years or younger (EOCC) (we excluded 6 cases diagnosed with familial adenomatous polyposis), and 97 consecutive patients with CRC diagnosed at an age of 70 years or older (LOCC), were collected at our institution. They were considered the index case of each family.

The age of 45 years or younger was chosen as an inclusion criterion because although there is no consensus on a specific age, according to the literature, it is the age range where the majority of genetic and phenotypic alterations are found. The age of 70 years or older was chosen as an inclusion criterion because according to the World Health Organization, 65–70 years old is the cut-off point from which a patient is considered older. Patients between 45 and 70 years of age were not included since, according to the literature, cases may behave like late genetic syndromes or attenuated or more frequently as sporadic tumors, thus overlapping with both groups. This may be a cause of confusion factor that leads to false conclusions [28–31].

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of the “12 de Octubre” University Hospital. Personal and clinicopathological information was obtained including age of onset, gender, location of the CRC (right/left colon or rectum), grade of cell differentiation (low, medium or high), mucin production, the presence of “serrated ring” cells, TNM stages (6th version), the existence of polyps during follow-up, type of polyps (adenomatous, hyperplastic or mixed), the presence of synchronous or metachronous CRCs (SCRC or MCRC), and primary multiple neoplasms in the index case. The tumors (adenocarcinomas) were pathologically confirmed by a single pathologist.

Right colon tumors have been defined as those ranging from the caecum to the proximal two-thirds of the transverse colon and left colon tumors as those ranging from the distal third of the transverse colon, including the splenic flexure, to the sigmoid colon. Rectal cancers are defined as those until 16 cm from anal verge (rectosigmoid junction).

To analyze the antecedents of cancer, families were classified into four groups: (a) families fulfilling the Amsterdam II criteria for Lynch syndrome (LS) [10]; (b) families with mainly aggregation—at least

one in first-degree or two in second-degree family members of LS-related neoplasms; (c) families with mainly aggregation of LS-related neoplasms; (d) cases without oncological antecedents; these were considered sporadic cases.

Follow-up was at least 5 years from surgery; DFS and overall survival (OS), recurrence and cancer-related death were recorded for each case and were included in the different statistical tables as a mean.

4.2. Microsatellite Instability and Mutational Analysis

A microsatellite instability (MSI) analysis was performed using the Bethesda panel [34], as published before [1]. Tumors were considered as MSI when showing high-frequency MSI (MSI-H; two or more of the five markers showing instability), while the rest (including MSI-L) were classified as MSS.

MSI cases were screened for germline mutations in the mismatch repair (MMR) system genes MLH1, MSH2 and MSH6 as previously reported, with minor modifications [35].

Sporadic MSI cases were identified by determining the methylation status of the MLH1 gene promoter, as well as assessing the V600E mutation in the BRAF gene. The methods used were described previously [4].

4.3. Analysis of CpG Island Methylation Phenotype Panel

Methylation status of promoter regions of the CpG island methylation phenotype (CIMP) panel genes ACNA1G, CDKN2A, CRABP1, IGF2, MLH1, NEUROG1, RUNX3 and SOCS1 were analyzed as published before [4]. CIMP-High was defined as the presence of $\geq 6/8$ methylated promoters, CIMP-Low as 1/8 to 5/8 methylated promoters, and CIMP-0 as the absence (0/8) of methylated promoters.

4.4. Molecular Classification

Based on the MSI and CIMP status, we divided both age groups into four categories because differences between MSI-L and MSS are subtle and differences between CIMP-Low and CIMP-0 are also subtle: (MSI/CIMP-High); (MSI/CIMP-Low/0); (MSS/CIMP-High); and (MSS/CIMP-Low/0) [12].

4.5. Chromosomal Instability Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)

A CGH was performed using oligonucleotide microarrays (Roche NimbleGen, Inc., Reykjavik, Iceland) in order to identify copy number alterations (CNA) for both age-of-onset subgroups and has been described before [10]. The degrees of genomic instability were also described in that same study. Both datasets were included in the gene expression omnibus (GEO): LOCC (GSE108166) and EOCC (GSE108203).

4.6. Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as mean values plus/minus standard deviation (SD), and categorical variables were expressed as the number of cases and their percentage. Differences were considered significant when $p < 0.05$. For associations between colon location and other discrete variables, statistical analyses were performed using Pearson’s chi-square (χ^2) test for parametric variables, and Fisher’s exact test for non-parametric variables. When those features were continuous variables, Student’s t-test was used. The SPSS v.11.5 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) statistical package was used.

For the CGH analysis, both univariate and multivariate analysis was carried out to identify significant minimum regions. Regarding the univariate analysis, unconditional logistic regression was done for each candidate region. For the multivariate analysis, each of the regions was tested separately, including other relevant clinical variables. Location was considered a factor in all analyses carried out.

We selected only regions larger than 1 Mb, to avoid any possible bias. This analysis was performed in R Statistical Software [54].

5. Conclusions

In our opinion, dividing CRC according to both location and age-of-onset criteria is meaningful, not only because it homogenizes the resulting categories, but also because it facilitates new approaches in those subsets of which the molecular basis remains as yet unknown: high CIN left-sided EOCC, left-sided LOCC with multiple primary neoplasms, or EOCC with a familial component and advanced stage at diagnosis. The subclassification also helps to define clinically which tumors are more likely to show certain already described molecular alterations, such as for example changes affecting NDRG2 or GAB2. Comparison with the consensus molecular classification also confirms the importance of considering both criteria when studying CRC. With the confirmation across larger studies, new therapeutic approaches could be defined according to the classification of the age-of-onset and the location of the tumor.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/4/968/s1>. Table S1: Differential chromosomal regions between each age-of-onset group, for each colon location.

Author Contributions: Conceptualization, J.P., L.B., J.L.G., D.G.O., A.G., M.U. and R.G.S.; methodology, J.P., L.B., J.L.G., D.G.O., A.G., M.U. and R.G.S.; investigation, J.P., J.M.C., J.L.G., M.A., D.R., J.P., M.G.-A. and R.G.S.; resources, L.B., J.M.C., J.P., D.R., S.O.S., M.A., Y.R., J.A., A.C., E.A., C.G., M.U. and R.G.S.; formal analysis, J.M.C., J.P., J.L.G., L.I.-P., A.G., M.U. and R.G.S.; writing—original draft preparation, J.P., J.M.C., D.G.O., A.G., M.U. and R.G.S.; writing—review and editing, all authors.

Funding: This work was funded by Project PI10/0683 and PI13/0127 and PI16/0050 to J.P. and PI16/01920 to R.G.S. and PI17/01233 to D.G.O. from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs, and co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF), and supported by grants RD16/0003, CA18/001, CA18/002, and U10 CA18/006 from the National Cancer Institute, National Institutes of Health to Ajay Goel.

Acknowledgments: We thank Ron Hartwig for his help with the English revision of this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

aCGH	array of Comparative Genomic Hybridization
CMF	CGI Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomal Instability
CRC	Colorectal cancer
CMS	Consensus Molecular subtype
CNA	Copy Number Alterations
DFS	Disease-Free survival
EOCC	Early-onset colon cancer
EOCRC	Early-onset colorectal cancer
EBIC	Early-onset rectal cancer
GEO	Gene Expression Omnibus
LOCC	Late-onset colon cancer
LOCRC	Late-onset colorectal cancer
LORC	Late-onset rectal cancer
LS	Lynch syndrome
MCRC	Metachronous colorectal cancer
MMR	Mismatch Repair
MSI	Microsatellite instability
MSI	Microsatellite instability
OS	Overall survival
SCNA	somatic copy number alterations
SCRC	Synchronous colorectal cancer
SD	Standard Deviation

References

- Forlay, J.; Stelzerova-Foucher, E.; Lortet-Tieulent, J.; Rosso, S.; Coebergh, J.W.W.; Comber, H.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 1374–1403. [CrossRef] [PubMed]
- Ahnen, D.J.; Wad, S.W.; Jones, W.F.; Sifri, R.; Mendoza-Silvera, J.; Greenamyre, J.; Guiffo, S.; Axilbund, J.; Spiegel, A.; You, Y.N. The increasing incidence of young-onset colorectal cancer: A call to action. *Mayo Clin. Proc.* **2014**, *89*, 216–224. [CrossRef] [PubMed]
- Perea, J.; Alvaro, E.; Rodríguez, Y.; Gravalos, C.; Sánchez-Tomé, E.; Rivera, B.; Colina, F.; Carbonell, P.; González-Sarmiento, R.; Hidalgo, M.; et al. Approach to early-onset colorectal cancer: Clinicopathological, familial, molecular and immunohistochemical characteristics. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *16*, 3697–3703. [CrossRef]
- Perea, J.; Rueda, D.; Canal, A.; Rodríguez, Y.; Alvaro, E.; Oseorio, I.; Alegre, C.; Rivera, B.; Martínez, J.; Benítez, J.; et al. Age at onset should be a major criterion for subclassification of colorectal cancer. *J. Mol. Diagn.* **2014**, *16*, 116–126. [CrossRef]
- Boardman, L.A.; Johnson, R.A.; Viker, K.B.; Hafner, K.A.; Jenkins, R.R.; Riegert-Johnson, D.L.; Smyrk, T.C.; Litzelman, K.; See, S.; Gangnon, R.E.; et al. Correlation of chromosomal instability, telomere length and telomere maintenance in microsatellite-stable rectal cancer: A molecular subclass of rectal cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60035. [CrossRef] [PubMed]
- Iacopetta, B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int. J. Cancer* **2002**, *101*, 403–408. [CrossRef] [PubMed]
- Gleber, O.K.; Rodríguez, L.M.; Nakahara, K.; Jenkins, J.; Clatti, J.; Humbyrd, C.J.; DeNobile, J.; Soballe, P.; Simon, R.; Wright, G.; et al. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2003**, *12*, 755–762.
- Stadhjornsson, P.; Jonasson, L.; Jonsson, T.; Möller, P.H.; Theodorsson, A.; Jonasson, J.G. Colon cancer in Iceland—a nationwide comparative study on various pathology parameters with respect to right and left tumor location and patients age. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 2645–2653. [CrossRef]
- Perea, J.; Cano, J.M.; Rueda, D.; García, J.L.; Inglada, L.; Oseorio, I.; Arriba, M.; Pérez, J.; Gaspar, M.; Fernández-Miguel, T.; et al. Classifying early-onset colorectal cancer according to tumor location: New potential subcategories to explore. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 2308–2313.
- Arriba, M.; García, J.L.; Inglada-Pérez, L.; Rueda, D.; Oseorio, I.; Rodríguez, Y.; Alvaro, E.; Sánchez, R.; Fernández, T.; Pérez, J.; et al. DNA copy number profiling reveals different patterns of chromosomal instability within colorectal cancer according to the age of onset. *Mol. Carcinog.* **2016**, *55*, 705–716. [CrossRef]
- Brandariz, L.; Arriba, M.; García, J.L.; Cano, J.M.; Rueda, D.; Rubio, E.; Rodríguez, Y.; Pérez, J.; Vivas, A.; Sánchez, C.; et al. Differential clinicopathological and molecular features within late-onset colorectal cancer according to tumor location. *Oncotarget* **2018**, *9*, 15302–15311. [CrossRef] [PubMed]
- Ogino, S.; Goel, A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J. Mol. Diagn.* **2008**, *10*, 13–27. [CrossRef] [PubMed]
- Reng, M.; Agoston, T.H.; Thiss-Eversen, E.; INFAC Study Group; Merok, M.A.; Teisveth, M.R.; Vatn, M.H.; Nishikawa, A.; Skibsted, L.; Løthe, R.A. Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. *Mol. Cancer* **2010**, *5*, 100. [CrossRef] [PubMed]
- Ishizuka, Y.; Itoh, F.; Tahara, T.; Ikeda, I.; Sugimura, T.; Tucker, J.; Ferritti, A.; Carrano, A.V.; Nagao, M. Human wt p53 oncogene mapped to chromosome 10q12.1. *Oncogene* **1989**, *4*, 1319–1321. [PubMed]
- Xu, X.; Li, J.; Sun, X.; Guo, Y.; Chu, D.; Wei, L.; Li, X.; Yang, G.; Liu, X.; Yao, L.; et al. Tumor suppressor NDRG2 inhibits glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer cells by repressing c-Myc expression. *Oncotarget* **2015**, *6*, 26161–26176. [CrossRef] [PubMed]
- Shen, L.; Qu, X.; Ma, Y.; Zheng, J.; Chu, D.; Liu, B.; Li, X.; Wang, M.; Xu, C.; Liu, N.; et al. Tumor suppressor NDRG2 tips the balance of oncogenic TGF- β via EMT inhibition in colorectal cancer. *Oncogenesis* **2014**, *3*, e86. [CrossRef] [PubMed]
- Hong, S.N.; Kim, S.J.; Kim, E.-R.; Chang, D.K.; Kim, Y.-H. Epigenetic silencing of NDRG2 promotes colorectal cancer proliferation and invasion. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *31*, 164–171. [CrossRef]

- Schaid, D.J.; Stanford, J.L.; McDonnell, S.K.; Suatnietni, M.; McIntosh, L.; Karyadi, D.M.; Carlson, E.E.; Deutsch, K.; Jener, M.; Hood, L.; et al. Genome-wide linkage scan of prostate cancer Gleason score and confirmation of chromosome 17q. *Hum. Genet.* **2007**, *121*, 729–735. [CrossRef]
- Blaumüller, C.M.; Qi, H.; Zagouras, P.; Artavanis-Tsakonas, S. Intracellular clearance of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Gli* **1997**, *80*, 281–291. [CrossRef]
- Ding, C.; Luo, J.; Li, L.; Li, S.; Yang, L.; Pan, H.; Liu, Q.; Qiu, H.; Chen, C.; Feng, J. GAB2 facilitates epithelial-to-mesenchymal transition via the MEK/ERK/MMP signaling in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2016**, *35*, 5. [CrossRef]
- Zhou, H.-T.; Shi, Z.-Z.; Zhou, Z.-X.; Jiang, Y.-Y.; Han, J.-J.; Zhang, T.-T.; Shi, F.; Xu, X.; Wang, M.-R.; Zhang, Y. Genomic changes in rectal adenocarcinoma associated with liver metastasis. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **2013**, *13*, 281–288. [CrossRef] [PubMed]
- Gulwary, J.; Diermeier, R.; Wang, X.; de Reynolds, A.; Schlicker, A.; Sorenson, C.; Marisa, L.; Roeyman, P.; Nymanandanda, G.; Angelino, P.; et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1350–1356. [CrossRef] [PubMed]
- Tran, B.; Kopetz, S.; Tie, J.; Gibbs, P.; Jiang, Z.-Q.; Lieu, C.H.; Agarwal, A.; Maru, D.M.; Sieber, O.; Desai, J. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* **2011**, *117*, 4623–4632. [CrossRef] [PubMed]
- Gavin, P.G.; Colangelo, L.H.; Funagalli, D.; Tanaka, N.; Remillard, M.Y.; Yothers, G.; Kim, C.; Taniyama, Y.; Kim, S.I.; Choi, H.J.; et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: An assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 6531–6541. [CrossRef] [PubMed]
- Popovici, V.; Budinska, E.; Bosman, F.T.; Tejpar, S.; Roth, A.D.; Delorenzi, M. Context-dependent interpretation of the prognostic value of BRAF and KRAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 439. [CrossRef] [PubMed]
- Bailey, C.E.; Hu, C.-Y.; You, Y.N.; Bednarski, B.K.; Rodriguez-Bigas, M.A.; Skibber, J.M.; Cantor, S.B.; Chang, G. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975–2010. *JAMA Surg.* **2015**, *150*, 17–22. [CrossRef] [PubMed]
- Patel, S.G.; Ahnen, D.J. Colorectal Cancer in the Young. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2018**, *20*, 15. [CrossRef] [PubMed]
- Tanaka, K.; Walenkamp, A.M.; de Vries, E.G.; van Vugt, M.A.; Beets-Tan, R.G.; van Elten, B.; de Groot, D.J.; Hoopers, G.A. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat. Res.* **2015**, *41*, 671–679. [CrossRef]
- Al-Barrak, J.; Gill, S. Presentation and outcomes of patients aged 70 years and younger with colorectal cancer: A 20-year retrospective review. *Mod. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **2011**, *28*, 1058–1061. [CrossRef]
- Fazel, M.S.; Adeli, M.G.; Lebaschi, A.H. Colorectal carcinoma: A retrospective, descriptive study of age, gender, subsite, stage, and differentiation in Iran from 1995 to 2001 as observed in Tehran University. *Dis. Colon Rectum* **2007**, *50*, 960–965. [CrossRef]
- Campos, F.G. Colorectal cancer in young adults: A difficult challenge. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 5041–5044. [CrossRef] [PubMed]
- Zagari, A.; Antón-Culver, H. Validation of family history data in cancer family registries. *Am. J. Prev. Med.* **2003**, *24*, 190–198. [CrossRef]
- Aaltomäki, L.A.; Peltomäki, P.; Mecklin, J.P.; Järvinen, H.; Jass, J.R.; Green, J.S.; Lynch, H.T.; Watson, P.; Taitt, G.; Juhola, M. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1645–1648. [PubMed]
- Boland, C.R.; Thibodeau, S.N.; Hamilton, S.R.; Sidransky, D.; Eshleman, J.R.; Burt, R.W.; Meltzer, S.J.; Rodriguez-Bigas, M.A.; Fodde, R.; Ranzani, G.N.; et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5248–5257. [PubMed]

- Perea, J.; Rodríguez, Y.; Rueda, D.; Martín, J.C.; Díaz-Torres, J.; Alvaro, E.; Alegre, C.; Oseorio, I.; Colina, F.; Nishikawa, A.; Skibsted, L.; Løthe, R.A. Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. *Mol. Cancer* **2010**, *5*, 100. [CrossRef] [PubMed]
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2012; ISBN 3-900051-07-0. Available online: <http://www.R-project.org/> (accessed on 1 April 2016).



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

TABLA COMPLEMENTARIA 1. Regiones cromosómicas recurrentemente alteradas según su localización tumoral en el CCRAT

Tabla complementaria 1. REGIONES CROMOSÓMICAS RECURRENTEMENTE ALTERADAS SEGÚN SU LOCALIZACION TUMORAL EN EL CCRAT

Colon derecho	Región	%	Colon izquierdo	Región	%	Recto	Región	%
Cromosoma 1	p32.3 p31.3	49	Cromosoma 1	q21.1 q21.2	32	Cromosoma 1	p36.33 p36.32	38
Cromosoma 1	p31.2 p31.1	51	Cromosoma 4	q12 q13.2	32	Cromosoma 1	p36.32 p36.31	41
Cromosoma 1	p21.3 p13.3	49	Cromosoma 5	p15.33 p15.31	32	Cromosoma 1	p36.13 p36.13	38
Cromosoma 1	p21.3 p21.3	51	Cromosoma 7	p22.1 p22.1	32	Cromosoma 1	p35.3 p35.1	38
Cromosoma 1	p21.2 p21.1	51	Cromosoma 7	q11.22 q11.23	32	Cromosoma 1	p35.2 p35.1	41
Cromosoma 2	p25.3 p25.1	49	Cromosoma 7	q11.23 q11.23	37	Cromosoma 1	p33 p33	38
Cromosoma 2	p25.3 p25.2	51	Cromosoma 8	p22 p22	32	Cromosoma 1	p32.3 p31.3	38
Cromosoma 2	q14.3 q14.3	49	Cromosoma 10	q11.21 q11.23	42	Cromosoma 1	p32.3 p31.1	41
Cromosoma 2	q22.1 q22.1	49	Cromosoma 10	q26.13 q26.3	32	Cromosoma 1	p31.2 p31.1	38
Cromosoma 3	p14.1 p13	49	Cromosoma 10	q26.2 q26.3	37	Cromosoma 1	p21.3 p13.3	38
Cromosoma 4	p16.1 p15.2	49	Cromosoma 14	q11.2 q21.3	32	Cromosoma 1	q21.1 q21.2	38
Cromosoma 4	q34.3 q35.2	51	Cromosoma 14	q22.1 q32.2	32	Cromosoma 2	p16.1 p16.1	38
Cromosoma 7	p22.1 p22.1	51	Cromosoma 14	q32.13 q32.2	37	Cromosoma 3	p26.3 p26.2	38
Cromosoma 7	p12.1 p11.2	49	Cromosoma 16	p12.2 p11.2	32	Cromosoma 3	p26.1 p26.1	38
Cromosoma 7	p11.2 p11.2	54	Cromosoma 16	p11.2 p11.2	37	Cromosoma 3	p13 p12.1	38
Cromosoma 7	q11.21 q11.21	60	Cromosoma 16	q21 q21	32	Cromosoma 3	p11.1 p11.1	38
Cromosoma 7	q11.21 q11.23	51	Cromosoma 18	q12.1 q12.2	32	Cromosoma 4	p16.1 p16.1	41
Cromosoma 7	q11.21 q11.22	49	Cromosoma 18	q21.1 q21.1	32	Cromosoma 4	p16.1 p15.31	44
Cromosoma 7	q11.22 q11.23	57	Cromosoma 18	q22.1 q23	32	Cromosoma 4	p15.33 p15.1	41
Cromosoma 7	q11.23 q11.23	60	Cromosoma 20	q11.1 q11.23	32	Cromosoma 4	p15.32 p14	38
Cromosoma 7	q21.2 q21.2	51	Cromosoma 20	q12 q13.33	32	Cromosoma 5	p15.33 p15.31	41
Cromosoma 7	q21.2 q22.1	54				Cromosoma 5	q13.2 q13.2	41
Cromosoma 7	q21.2 q22.3	49				Cromosoma 5	q31.1 q31.2	38
Cromosoma 7	q21.3 q22.3	57				Cromosoma 7	p11.2 p11.2	41
Cromosoma 7	q22.1 q22.1	60				Cromosoma 7	q11.21 q11.21	38
Cromosoma 7	q22.1 q22.3	54				Cromosoma 7	q11.21 q11.22	41
Cromosoma 7	q22.1 q32.2	51				Cromosoma 7	q11.22 q11.23	56
Cromosoma 7	q32.1 q32.3	49				Cromosoma 7	q22.1 q22.1	41
Cromosoma 7	q33 q34	49				Cromosoma 9	p13.1 p13.1	41
Cromosoma 8	q24.12 q24.21	49				Cromosoma 9	p13.1 p11.2	38
Cromosoma 9	p13.1 p13.1	49				Cromosoma 9	q12 q13	38
Cromosoma 9	p11.2 p11.2	49				Cromosoma 13	q21.33 q22.1	38
Cromosoma 9	q12 q13	51				Cromosoma 13	q32.1 q32.3	41
Cromosoma 9	q13 q21.11	49				Cromosoma 13	q32.1 q33.3	38
Cromosoma 15	q25.2 q26.1	49				Cromosoma 13	q34 q34	38
Cromosoma 15	q26.1 q26.2	51				Cromosoma 16	p13.12 p13.11	41
Cromosoma 16	p13.11 p13.11	49				Cromosoma 16	p13.11 p11.2	44
Cromosoma 16	p13.11 p12.3	51				Cromosoma 16	p12.3 p11.2	38
Cromosoma 18	p11.32 p11.31	54				Cromosoma 18	q12.2 q12.3	38
Cromosoma 18	p11.32 p11.23	49				Cromosoma 18	q21.33 q22.3	38
Cromosoma 18	p11.22 p11.21	49				Cromosoma 19	p13.3 p13.2	44
Cromosoma 18	q11.2 q11.2	49				Cromosoma 19	p13.3 p13.11	41
Cromosoma 18	q11.2 q12.3	51				Cromosoma 19	q13.42 q13.43	38
Cromosoma 18	q12.1 q12.2	49				Cromosoma 19	q13.43 q13.43	41
Cromosoma 18	q21.1 q23	49				Cromosoma 20	p13 p13	38
Cromosoma 18	q21.1 q21.2	54				Cromosoma 20	p11.1 q11.1	44
Cromosoma 18	q21.2 q23	51				Cromosoma 20	q11.21 q11.22	50
Cromosoma 18	q21.31 q23	54				Cromosoma 20	q11.1 q11.23	47
Cromosoma 18	q22.1 q22.3	57				Cromosoma 20	q11.22 q11.23	44
Cromosoma 18	q22.2 q22.3	60				Cromosoma 20	q11.23 q11.23	38
Cromosoma 18	q22.3 q23	57				Cromosoma 20	q12 q12	38
Cromosoma 20	q11.1 q11.23	51				Cromosoma 20	q12 q13.13	41
Cromosoma 20	q12 q13.2	49				Cromosoma 20	q13.13 q13.2	44
						Cromosoma 20	q13.2 q13.33	38
						Cromosoma 22	q11.21 q13.33	38

Verde: ganancias; rojo: pérdidas.

TABLA COMPLEMENTARIA 2. Regiones cromosómicas recurrentemente alteradas según su localización tumoral en el CCRJ

Tabla complementaria 2. REGIONES CROMOSÓMICAS RECURRENTEMENTE ALTERADAS SEGÚN SU LOCALIZACIÓN TUMORAL EN EL CCRJ

Colon derecho	Región		%	Colon izquierdo	Región		%	Recto	Región		%
Cromosoma 1	q12	q21.2	69	Cromosoma 1	p36.22	p35.3	50	Cromosoma 5	q13.2	q13.2	42
Cromosoma 1	q21.1	q21.2	62	Cromosoma 1	p36.11	p36.11	46	Cromosoma 6	p21.31	p21.2	47
Cromosoma 5	q13.2	q13.2	69	Cromosoma 1	p35.3	p35.1	46	Cromosoma 8	p23.1	p23.1	47
Cromosoma 7	p22.3	p22.2	62	Cromosoma 1	q21.1	q21.1	61	Cromosoma 9	p13.1	p13.1	42
Cromosoma 7	p22.2	p22.1	54	Cromosoma 5	q13.2	q13.2	64	Cromosoma 9	p12	p12	42
Cromosoma 7	q11.23	q11.23	62	Cromosoma 6	p21.31	p21.2	46	Cromosoma 9	p12	q21.11	47
Cromosoma 7	q11.23	q11.23	62	Cromosoma 7	p22.3	p22.3	46	Cromosoma 9	q21.11	q21.11	42
Cromosoma 7	q21.3	q22.1	54	Cromosoma 7	q11.23	q11.23	46	Cromosoma 10	q11.22	q11.22	47
Cromosoma 7	q22.1	q22.1	69	Cromosoma 7	q22.1	q22.1	46	Cromosoma 11	q14.1	q14.1	42
Cromosoma 9	p13.1	p13.1	69	Cromosoma 9	p12	p11.2	57	Cromosoma 11	q24.3	q25	42
Cromosoma 9	p12	q13	77	Cromosoma 9	q13	q13	57	Cromosoma 11	q25	q25	47
Cromosoma 9	p12	p11.2	85	Cromosoma 9	q21.11	q21.11	57	Cromosoma 12	q13.11	q13.2	47
Cromosoma 9	q13	q21.11	69	Cromosoma 9	q33.3	q34.3	46	Cromosoma 14	q11.1	q11.2	53
Cromosoma 9	q33.3	q34.3	62	Cromosoma 10	q11.21	q11.22	57	Cromosoma 17	q12	q21.32	47
Cromosoma 10	q11.22	q11.22	77	Cromosoma 11	p11.12	p11.12	61	Cromosoma 17	q21.31	q21.32	53
Cromosoma 10	q21.3	q22.1	54	Cromosoma 11	q12.3	q13.3	46	Cromosoma 17	q22	q25.3	47
Cromosoma 11	p11.12	p11.12	62	Cromosoma 11	q13.1	q13.2	50	Cromosoma 18	q12.3	q12.3	42
Cromosoma 11	q13.1	q13.2	54	Cromosoma 11	q14.2	q14.3	57	Cromosoma 19	p13.3	q13.43	58
Cromosoma 12	q13.13	q13.2	54	Cromosoma 13	q33.3	q34	46	Cromosoma 20	p11.1	q13.2	47
Cromosoma 14	q24.2	q24.3	54	Cromosoma 14	q32.31	q32.32	46	Cromosoma 22	q11.1	q11.1	53
Cromosoma 16	p13.3	p13.3	54	Cromosoma 16	p13.3	p13.3	46	Cromosoma 22	q11.1	p22.33	47
Cromosoma 16	p13.12	p12.3	69	Cromosoma 16	q21	q22.1	54				
Cromosoma 16	p13.11	p13.11	62	Cromosoma 17	q21.1	q21.31	46				
Cromosoma 17	p11.2	p11.2	54	Cromosoma 17	q22	q25.3	46				
Cromosoma 17	q21.31	q21.32	62	Cromosoma 17	q24.3	q25.3	50				
Cromosoma 17	q24.3	q25.3	62	Cromosoma 19	p13.3	p13.11	54				
Cromosoma 19	p13.3	p13.42	69	Cromosoma 19	p13.11	p13.11	57				
Cromosoma 19	q13.2	q13.2	54	Cromosoma 19	q13.33	q13.43	46				
Cromosoma 19	q13.42	q13.43	62	Cromosoma 20	q11.1	q13.33	50				
Cromosoma 21	q22.3	q11.1	62	Cromosoma 20	q11.21	q11.23	54				
Cromosoma 21	q22.3	q22.3	59	Cromosoma 20	q11.21	q11.22	57				
Cromosoma 22	q12.1	q13.31	54	Cromosoma 20	q12	q13.12	54				
				Cromosoma 20	q13.2	q13.2	46				
				Cromosoma 22	q11.1	q11.1	50				
				Cromosoma 22	q11.1	q11.21	46				

Verde: ganancias; rojo: pérdidas.

