

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**Análisis en biopsia líquida del estado  
mutacional de los genes *RAS* en  
cáncer colorrectal metastásico.  
Implicaciones terapéuticas**

TRABAJO FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: MARÍA DEL MAR QUIÑONERO CORONEL

TUTORES: ELOÍSA JANTUS LEWINTRE

COTUTORA: SILVIA CALABUIG FARIÑAS

*Curso Académico: 2018-2019  
VALENCIA, 8 de julio de 2019*

Tipo de licencia: *Creative Commons*

**TÍTULO:** Análisis en biopsia líquida del estado mutacional de los genes *RAS* en cáncer colorrectal metastásico. Implicaciones terapéuticas.

## **RESUMEN**

El análisis de mutaciones en los genes *RAS* (*KRAS* y *NRAS*) es determinante a la hora de seleccionar el tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal metastásico, pues se sabe que mutaciones en dichos genes confieren resistencia a la terapia con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los cambios en el estado mutacional de dichos genes se pueden monitorizar mediante el análisis del ADN tumoral circulante (ADNtc), pero para ello se requieren tecnologías con una elevada sensibilidad y especificidad. El objetivo principal del presente trabajo es analizar el estado mutacional de los genes *KRAS* y *NRAS* en pacientes de cáncer colorrectal metastásico mediante tecnologías basadas en PCR digital en biopsia líquida; así como determinar el estatus mutacional durante la evolución tumoral.

El estudio se realizó con 25 pacientes con CCRm; realizando el análisis del estado mutacional de los genes *KRAS* y *NRAS* en plasma mediante el sistema de PCR digital en emulsión BEAMing (*Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics*) en el momento basal antes de iniciar tratamiento y analizando el grado de concordancia con los resultados de biopsia tisular. Posteriormente, se determinó la presencia de mutaciones en *RAS* mediante muestras de sangre seriadas durante los diferentes tratamientos de los pacientes.

Se detectaron mutaciones en el 40% de los casos en la determinación basal, con una concordancia general de 92% entre el análisis en tejido y plasma (índice Kappa=0,833, p-value<0,0001). Durante la monitorización de la evolución tumoral se advierten cambios en la concentración de ADN libre circulante (ADNlc), en el estado mutacional de *RAS* y en la fracción mutante. Trece pacientes progresaron al tratamiento en primera línea, lo que puede ser explicado por el aumento en los niveles de ADNlc y la detección de mutaciones en los genes *RAS*. Asimismo, mutaciones en estos genes se asocian con una menor supervivencia global (p-value=0,015).

En conclusión, el análisis del ADNtc mediante biopsia líquida constituye una excelente aproximación para la detección de mutaciones en los genes *RAS* en el momento del diagnóstico y durante la monitorización de la evolución tumoral en pacientes con CCRm, permitiendo seleccionar el tratamiento que mejor se ajusta a cada paciente en cada momento.

**PALABRAS CLAVE:** cáncer colorrectal, *RAS*, *KRAS*, *NRAS*, biopsia líquida, PCR digital (PCRd), ADN tumoral circulante (ADNtc)

**AUTORA:** María del Mar Quiñonero Coronel

**LOCALIDAD Y FECHA:** Valencia, julio 2019

**TUTORES ACADÉMICOS:** Eloísa Jantus Lewintre

**TUTOR/A INSTITUCIÓN:** Silvia Calabuig Fariñas

**TIPO DE LICENCIA:** *Creative Commons*

**TITLE:** Liquid biopsy analysis of the mutational state of *RAS* genes in metastatic colorectal cancer. Therapeutic implications.

## **SUMMARY**

Mutation analysis in *RAS* genes (*KRAS* and *NRAS*) is decisive to select the correct treatment for a metastatic colorectal cancer patient, as they are known to confer resistance to anti-EGFR monoclonal antibody therapy. Monitoring of *RAS* mutational status is possible by circulating tumor DNA (ctDNA) analysis, but ultrasensitive and high specificity methodologies are required. Therefore, the aim of this study is to analyze *KRAS* and *NRAS* mutational status of metastatic colorectal patients by digital PCR technologies at basal moment and tumor evolution monitoring.

The study was carried out in 25 metastatic colorectal patients. *RAS* mutations were analyzed by BEAMing system (Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics) to study concordances between tissue and liquid biopsy at basal moment. Later, *RAS* mutations detection was performed in blood samples from patients undergoing several treatment lines.

*RAS* mutations were detected in 40% of the cases at the basal moment. The overall percentage agreement between tissue-based and plasma-based *RAS* mutation testing was 92% (Kappa=0.833, p-value<0.0001). Changes in cell-free DNA (cfDNA) levels, *RAS* mutational status and mutant fraction were found by tumor evolution monitoring. Thirteen patients progressed on first line treatment, which can be explained by the increase of cfDNA levels and *RAS* mutations detection. Moreover, the presence of *RAS* mutations was correlated with poor overall survival (p-value=0.015).

In conclusion, ctDNA analysis by liquid biopsy represent an excellent approach to detect *RAS* mutations at basal moment and tumor evolution of metastatic colorectal patients in order to select the best treatment for each patient.

**KEYWORDS:** colorectal cancer, *RAS*, *KRAS*, *NRAS*, liquid biopsy, digital PCR (dPCR), circulant tumor DNA (ctDNA)

**AUTHOR:** María del Mar Quiñonero Coronel

**LOCATION AND DATE:** Valencia, July 2019

**ACADEMIC SUPERVISORS:** Eloísa Jantus Lewintre

**INSTITUTION SUPERVISOR:** Silvia Calabuig Fariñas

**LICENSE:** *Creative Commons*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Concepto de cáncer .....	1
1.2. Cáncer de colon.....	1
1.2.1. Epidemiología y factores de riesgo .....	2
1.2.2. Pruebas de cribado o diagnóstico .....	2
1.2.3. Tratamiento .....	2
1.2.4. Clasificación del CCR: de la histología a la biología molecular.....	3
1.3. Mutaciones somáticas en los genes <i>RAS</i> y <i>BRAF</i> .....	5
1.4. Genes <i>RAS</i> y <i>BRAF</i> como biomarcadores.....	6
1.5. Biopsia líquida .....	7
1.5.1. ADNtc .....	7
1.5.2. Ventajas y aplicaciones clínicas .....	7
1.6. Metodologías ultrasensibles basadas en PCR digital .....	8
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
3.1. Pacientes.....	11
3.2. Obtención del plasma y extracción de ADN .....	11
3.3. Análisis mutacional.....	11
3.3.1. Análisis del estado mutacional de los genes <i>RAS</i> en biopsia de tejido.....	11
3.3.2. Análisis del estado mutacional de los genes <i>RAS</i> en biopsia líquida .....	11
3.5. Análisis estadístico de los datos .....	14
3.5.1. Estudio de concordancia.....	14
3.5.2. Análisis de las variables .....	14
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
4.1. Características clinicopatológicas de la cohorte de estudio .....	15
4.2. Estado mutacional de los genes <i>RAS</i> .....	15
4.2.1. Biopsia de tejido.....	15
4.2.2. Biopsia líquida.....	17
4.2.3. Análisis de concordancia: tejido vs. ADNtc .....	19
4.3. Correlación del estado mutacional de <i>RAS</i> con las características clinicopatológicas.....	22
4.4. Monitorización de pacientes mediante biopsia líquida .....	22
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Propiedades de las células tumorales.....	1
Figura 2. Esquema secuencial de las mutaciones y alteraciones implicadas en el proceso tumorigénico del CCR para cada una de las vías iniciadoras (A, B, C).....	4
Figura 3. Clasificación de los distintos tipos moleculares de CCR.....	5
Figura 4. Cascadas de señalización de EGFR mediadas por RAS y RAF .....	5
Figura 5. Frecuencia de las mutaciones detectadas en <i>RAS</i> y <i>BRAF</i> en una cohorte de 2.121 tumores de cáncer colorrectal.....	6
Figura 6. Características biológicas y clínicas de la biopsia líquida .....	8
Figura 7. Metodologías para el análisis del ADNtc. ....	9
Figura 8. Flujo de trabajo de la tecnología BEAMing. ....	12
Figura 9. Ejemplos de los tres gráficos obtenidos tras el análisis por BEAMing .....	13
Figura 10. Ejemplos del tercer gráfico obtenidos tras el análisis por BEAMing .....	13
Figura 11. Resultados de la determinación de <i>RAS</i> por BEAMing en pacientes con CCRm. ....	18
Figura 12. Resultados del análisis por la metodología BEAMing en el paciente 23. ....	21
Figura 13. Niveles de ADNtc (ng/μl) de los pacientes de la cohorte durante la determinación basal en plasma por la metodología de BEAMing .....	23
Figura 14. Gráfico de supervivencia global de nuestra cohorte .....	24
Figura 15. Niveles de ADNtc (ng/μl) cuantificados en cada determinación de los pacientes que recibieron un tratamiento con anti-EGFR en primera línea, debido a que no se detectaron mutaciones en <i>RAS</i> .....	25
Figura 16. Evolución de los pacientes 9 y 18, en los cuales se detectó presencia de mutaciones en las dos determinaciones realizadas. ....	26
Figura 17. Monitorización del paciente 9.....	27
Figura 18. Monitorización del paciente 18.....	27
Figura 19. Monitorización del paciente 11.....	28
Figura 20. Monitorización de los cambios en la fracción mutante de los pacientes 7 y 12 .....	29
Figura 21. Monitorización paciente 7 .....	30
Figura 22. Monitorización del paciente 12.....	31
Figura 23. Monitorización del paciente 4.....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de concordancia entre tejido y biopsia líquida .....	14
Tabla 2. Características clinicopatológicas de la cohorte de estudio. ....	15
Tabla 3. Descripción de las mutaciones descritas en la cohorte de 25 pacientes. ....	16
Tabla 4. Frecuencia de las mutaciones en <i>KRAS</i> y <i>NRAS</i> en la cohorte, determinado por la metodología de BEAMing. ....	18
Tabla 5. Resumen de las determinaciones en tejido y plasma de <i>RAS</i> en nuestra cohorte. Asimismo, se muestra la concentración de ADNlc (ng/μl), el número de beads mutadas y la fracción mutante (%). ....	19
Tabla 6. Concordancia de los casos mutados y no mutados en biopsia líquida y tisular. ....	20
Tabla 7. Diferencias entre las muestras de tejido tumoral y plasma. ....	20

## ABREVIATURAS

**5-FU:** 5-fluorouracilo

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNlc:** ADN libre en circulación

**ADNtc:** ADN tumoral circulante

**ARN:** ácido ribonucleico

**ASCO:** *American Society of Clinical Oncology*

**APC:** *Adenomatous polyposis coli*

**BEAMing:** técnica de biopsia líquida (en inglés *Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics*)

**BRAF:** proto-oncogén B-RAF, serina treonina quinasa

**CCR:** cáncer colorrectal

**CCRM:** cáncer colorrectal metastásico

**CE:** Conformidad Europea

**CE-IVD:** Diagnóstico *In Vitro* de Conformidad Europea

**CIMP:** metilación de islas CpG

**CMS:** *Consensus Molecular Subtypes*

**CNV:** Variación en el Número de Copias

**CRCSC:** *Colorectal Cancer Subtyping Consortium*

**CTC:** célula tumoral circulante

**CTLA-4:** proteína localizada en las células T

**EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico

**EMR:** Enfermedad Mínima Residual

**ESMO:** *European Society for Medical Oncology*

**FM:** Fracción alélica Mutante

**IMS:** Inestabilidad de microsátélites

**KRAS:** *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

**MAPK:** Proteína Kinasa Activada por Mitógeno

**miARN:** micro-ARN

**MEC:** Matriz Extracelular

**MSI:** inestabilidad de microsátélites

**NCCN:** *National Comprehensive Cancer Network*

**NGS:** *Next Generation Sequencing* (Tecnologías de Secuenciación Masiva)

**NRAS:** *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**EmPCR:** reacción en cadena de la polimerasa en emulsión

**PCRd:** reacción en cadena de la polimerasa digital

**PCRm:** reacción en cadena de la polimerasa múltiple

**PD-1:** *Programmed cell death 1*

**PD-L1:** Ligando 1 de muerte programada (*Programmed cell death 1 ligand*)

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**QS3D dPCR:** QuantStudio™ 3D Digital PCR

**RAF:** familia de serina/treonina quinazas (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

**RAS:** familia de genes que codifican proteínas implicadas en vías de señalización para regular la multiplicación y destrucción de las células.

**SCNA:** alteraciones en el número de copias somáticas

**SEOM:** Sociedad Española de Oncología Médica

**SG:** Supervivencia Global

**SLP:** Supervivencia Libre de Progresión

**TAC:** Tomografía Axial Computarizada

**TP53:** gen supresor de tumores que codifica para un factor de transcripción nuclear

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. CONCEPTO DE CÁNCER

El término cáncer hace referencia a un conjunto de enfermedades caracterizadas fundamentalmente por el crecimiento incontrolado de células y su posterior invasión del tejido circundante, llegando a producir metástasis en puntos distantes del genoma (OMS, 2018).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron seis características que definen las células tumorales: autosuficiencia en señales de crecimiento, independencia de las señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la muerte programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). Unos años más tarde, en 2011, estos mismos autores completaron esta lista de características con cuatro más (*Figura 1*): inestabilidad genómica, desregulación del metabolismo energético, escape del sistema inmune e inflamación (Hanahan & Weinberg, 2011).



*Figura 1. Propiedades de las células tumorales (Modificado y traducido de Hanahan & Weinberg, 2011).*

El proceso de tumorigénesis implica alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de células normales en malignas, lo que permite a las células tumorales escapar de los mecanismos de homeostasis y de control de proliferación (Hanahan & Weinberg, 2000). Uno de los procesos tumorigénicos más estudiados y caracterizados, en cuanto a esa cadena de cambios y mutaciones, es el cáncer colorrectal (Fearon & Vogelstein, 1990).

## 1.2. CÁNCER DE COLON

El Cáncer Colorrectal (CCR) es un tipo de cáncer que se origina en el colon y recto. Según datos clínicos e histopatológicos, la mayoría de carcinomas se desarrollan a partir de tumores benignos preexistentes llamados adenomas. Los tumores colorrectales surgen como consecuencia de la acumulación de mutaciones genéticas y cambios epigenéticos, responsables de las propiedades biológicas del tumor (Fearon & Vogelstein, 1990).



### **1.2.1. Epidemiología y factores de riesgo**

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia global; en el año 2018 hubo más de 1,8 millones de casos nuevos (Globocan, 2018). Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), en España es el cáncer más frecuentemente diagnosticado con más de 34.000 casos detectados en 2017 (Vera et al., 2019).

El principal factor de riesgo para el CCR es la edad, siendo el 90% de los casos diagnosticados personas mayores de 50 años. Los factores genéticos, así como los ambientales, juegan un papel fundamental en la tumorigénesis del cáncer colorrectal. La mayoría de los casos son esporádicos, pero son considerados grupos de alto riesgo aquellos individuos con antecedentes familiares, como el síndrome de Lynch o el síndrome polipósico adenomatoso familiar. Con respecto a los factores ambientales, la mayoría constituyen factores de riesgo que son modificables por la población tales como la dieta alta en grasas, sobrepeso, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol y poca actividad física (Kuipers et al., 2015).

### **1.2.2. Pruebas de cribado o diagnosis**

Las pruebas de cribado han ayudado a reducir la incidencia en el cáncer colorrectal y las dos más empleadas son el análisis de sangre oculta en heces y la colonoscopia. El primer tipo prueba se realiza en individuos a partir de los 50 años para un cribado inicial y rápido, ya que se caracterizan por ser pruebas más sencillas y menos invasivas. Sin embargo, si el resultado es positivo no necesariamente implica la presencia de tumor, ya que se puede detectar sangre en heces por otras causas como pólipos, hemorroides u otras lesiones, por lo que es necesario confirmar con una colonoscopia. Este tipo de prueba es el método diagnóstico por excelencia ya que es muy sensible y específico. No obstante, se trata de una prueba más invasiva y lleva asociada ciertos riesgos, como el sangrado o perforaciones (Kuipers et al., 2015). Por este motivo, se buscan biomarcadores serológicos con una eficacia similar para el diagnóstico de CCR. En este sentido cobra una gran importancia la detección y cuantificación de ácidos nucleicos circulantes de origen tumoral, pues constituye una herramienta con un gran potencial como método de diagnóstico (Gil-Raga et al., 2018), como se explicará a lo largo del presente trabajo.

### **1.2.3. Tratamiento**

Los tres tipos principales de tratamiento del CCR son la cirugía, la quimioterapia (incluye anticuerpos monoclonales e inhibidores tirosina kinasa) y la radioterapia. Para conseguir una estrategia de tratamiento óptima es necesario un enfoque multidisciplinar con profesionales de distintos ámbitos y disciplinas como cirujanos, especialistas hepáticos y/o pulmón, patólogos, radiólogos, oncólogos y biólogos (Van Cutsem et al., 2016; Gómez-España et al., 2019).

- **Cirugía**

El tratamiento quirúrgico puede tener dos intenciones: curativa, con el fin de eliminar todo el tumor; o paliativa, para mejorar los síntomas. La decisión sobre el tratamiento debe ajustarse a cada paciente; no obstante, el primer paso es determinar la resecabilidad del tumor primario con los ganglios perirregionales. Adicionalmente, en el CCR metastásico (CCRM) también se intenta reseca las metástasis hepáticas y/o pulmonares (Van Cutsem et al., 2016; Gómez-España et al., 2019).

- **Quimioterapia**

La quimioterapia puede estar indicada como a) quimioterapia preoperatoria en enfermedad metastásica para intentar reducir el tamaño y número de metástasis y así poder realizar la resección quirúrgica de estas (quimioterapia neoadyuvante), b) tratamiento complementario a la cirugía (quimioterapia adyuvante) o c) en enfermedad metastásica no resecable para controlar el crecimiento del tumor y aliviar los síntomas (Kuipers et al., 2015; Van Cutsem et al., 2016).

En el cáncer colorrectal se recomienda neoadyuvancia con radioterapia o quimioterapia (5-fluorouracilo -5-FU- o Capecitabina). Con respecto al tratamiento adyuvante, comúnmente se administra una combinación de Oxaliplatino (Xelox o Folfox) (Kuipers et al., 2015).

En enfermedad metastásica se recomienda como primera línea de tratamiento combinar 5-FU con Oxaliplatino o Irinotecán (Folfox o Folfiri); como alternativa también se puede administrar Capecitabina y Oxaliplatino (Capox). En ocasiones, se pueden añadir a estos dobletes quimioterapéuticos agentes biológicos dirigidos que incrementen su acción citotóxica. Entre ellos se encuentran los anticuerpos monoclonales anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (Bevacizumab) y anti-EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) (Panitumumab y Cetuximab); proteínas de fusión dirigidas a factores angiogénicos (Aflibercept) e inhibidores tirosina kinasa (Regorafenib) (Kuipers et al., 2015; Van Cutsem et al., 2016; Gómez-España et al., 2019).

Es muy importante destacar que los anticuerpos Panitumumab y Cetuximab solo deben ser administrados en pacientes con tumores sin mutaciones en los genes *RAS* (*KRAS* y *NRAS*), pues aquellos individuos que presentan estos genes mutados no se benefician del tratamiento anti-EGFR. Por ello es de relevancia determinar el estado mutacional antes de seleccionar el tratamiento (Kuipers et al., 2015; Yiu & Yiu, 2016; Van Cutsem et al., 2016; Gómez-España et al., 2019).

- **Inmunoterapia**

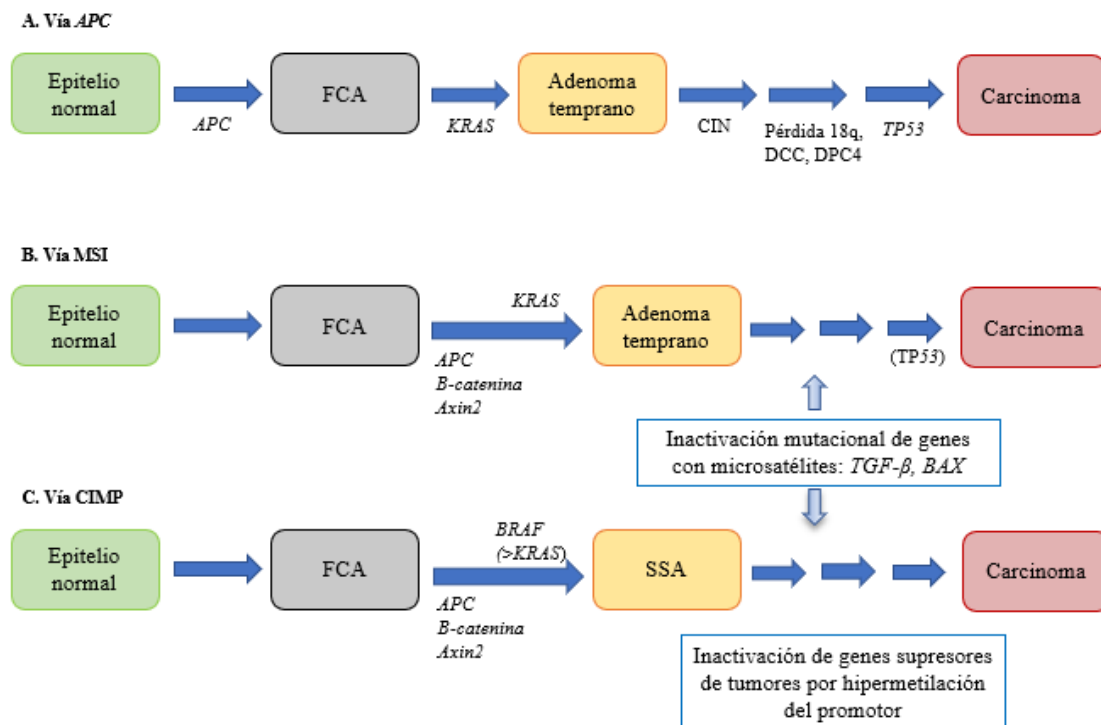
En el contexto del CCR, la inmunoterapia parece tener un papel muy importante en tumores caracterizados por la inestabilidad de microsatélites (IMS). La mayoría de los casos son esporádicos, asociados a la deficiencia del sistema de reparación de ADN (MMR) y muchos inhibidores de los puntos de control inmunitarios (PD1, PDL1 o CTLA4) presentan altos niveles de expresión, por lo que es posible administrar una terapia de bloqueo con anticuerpos monoclonales. Diversos estudios con anticuerpos anti-PD1 (Pembrolizumab, Nivolumab) han evidenciado una gran tasa de respuesta en pacientes con elevada IMS, por lo que este subgrupo de pacientes constituyen buenos candidatos para recibir dichas terapias (Kalyan et al., 2018).

#### **1.2.4. Clasificación del CCR: de la histología a la biología molecular**

El CCR es una enfermedad heterogénea en la que se distinguen diferentes subtipos según las características clínicas, histológicas y/o moleculares. Es muy importante comprender el fundamento molecular del inicio, desarrollo y progresión de la enfermedad, así como los mecanismos de respuesta o resistencia a los distintos tratamientos con el fin de encontrar diferentes biomarcadores diagnósticos y pronósticos (Nguyen & Duong, 2018).

Se ha descrito la secuencia de alteraciones específicas de cada etapa en el proceso tumorigénico del CCR. En la *Figura 2* se muestran las vías iniciadoras del CCR. La primera vía es la más común, es conocida como la vía de la inestabilidad cromosómica (INC) y se inicia por la inactivación del gen supresor de tumores *APC* (*Adenomatous polyposis coli*). A continuación, los

eventos más destacados son mutaciones que producen la activación de oncogenes (*RAS*) y la inactivación de genes supresores de tumores (*DPC4*, *TP53*). La segunda vía se caracteriza por la inestabilidad de microsatélites (IMS) debido a la deficiencia en el sistema de reparación del ADN (MMR) y, la tercera, por la hipermetilación de las islas CpGs (CIMP).



**Figura 2.** Esquema secuencial de las mutaciones y alteraciones implicadas en el proceso tumorogénico del CCR para cada una de las vías iniciadoras (A, B, C). FCA: fosa críptica aberrante; IMS: inestabilidad de microsatélites; CIMP: metilación de islas CpGs; SSA: adenoma serrado sésil; CIN: inestabilidad cromosómica (Modificado y traducido de Fearon, 2011).

El *CRC Subtyping Consortium* (CRCSC) se creó para evaluar la presencia de patrones con el fin de lograr una caracterización molecular del CCR. El resultado fue un sistema de clasificación molecular que permite categorizar la inmensa mayoría de los tumores (97%) en uno de los cuatro subtipos: CMS1 (IMS elevada), CMS2 (canónico), CMS3 (metabólico) y CMS4 (mesenquimal).

Los tumores CMS1 representan el 14% de los casos y se caracterizan por una elevada hipermetilación de las islas CpG e inestabilidad de microsatélites (IMS); CMS2 es el más común (37%), engloba tumores con una elevada tasa de mutaciones somáticas, indicando inestabilidad cromosómica; CMS3 comprende tumores con desregulación metabólica (13%) y, por último, CMS4 engloba tumores caracterizados por una gran invasión del estroma y activación de TGF- $\beta$  y angiogénesis (23%) (Figura 3) (Guinney et al., 2015).

Esta clasificación proporciona un sistema robusto y reproducible para el CCR siendo la base para futuros ensayos clínicos (Guinney et al., 2015; Van Cutsem et al., 2016). No obstante, no todos los casos de CCR encajan perfectamente en los distintos subgrupos y son considerados como subtipo indeterminado, por lo que es necesario perfeccionar la clasificación (Guinney et al., 2015).

CMS1 (MSI elevado)	CMS2 (canónico)	CMS3 (metabólico)	CMS4 (mesenquimal)
14%	37%	13%	23%
IMS elevada, CIMP, hipermutación	Elevada SCNA	Moderado IMS, SCNA y CIMP disminuido	Elevada SCNA
Mutaciones en <i>BRAF</i>		Mutaciones en <i>KRAS</i>	
Infiltración inmune y activación	Activación de WNT y MYC	Desregulación metabólica	Infiltración estromal, activación de TGF-β y angiogénesis
Peor supervivencia tras recaída			Peor supervivencia global y libre de recaída

Figura 3. Clasificación de los distintos tipos moleculares de CCR. Los diferentes subgrupos se caracterizan por la alteración de diferentes rutas. IMS: inestabilidad de microsatélites; CIMP: metilación de islas CpGs; SCNA: alteración en el número de copias somáticas. (Traducido de Guinney et al., 2015).

### 1.3. MUTACIONES SOMÁTICAS EN LOS GENES RAS Y BRAF

Los genes *RAS* son un conjunto de tres genes (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) que codifican para proteínas de membrana con actividad GPTasa, las cuales se expresan en la mayoría de las células. Están implicados en una gran variedad de rutas que controlan diferentes procesos como proliferación, diferenciación, adhesión, migración celular y apoptosis. Las proteínas *RAS* se encuentran alteradas con frecuencia en los tumores malignos, provocando un aumento en la capacidad de invasión y metástasis. Dichas mutaciones ocurren en los dominios de unión al GTP, por lo que se imposibilita la liberación de este y se mantiene la proteína funcionalmente activa. Como resultado, tiene lugar una activación aberrante de las rutas de señalización, independientemente de las señales *upstream* del EGFR (Figura 4) (Normanno et al., 2009).

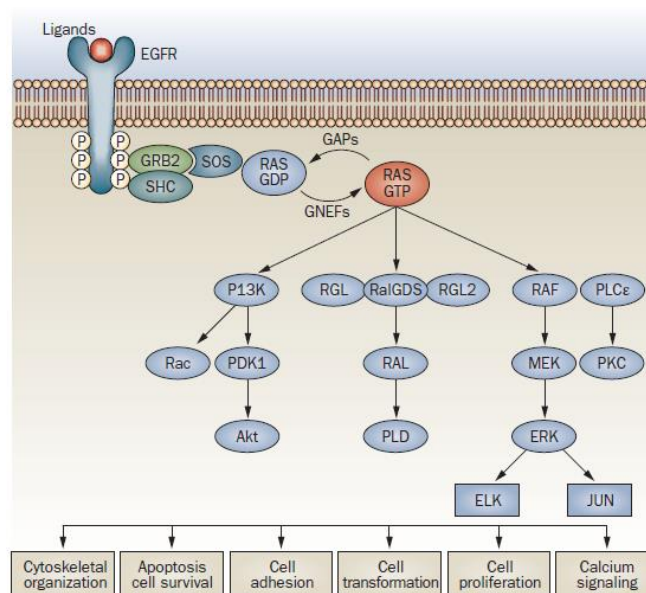
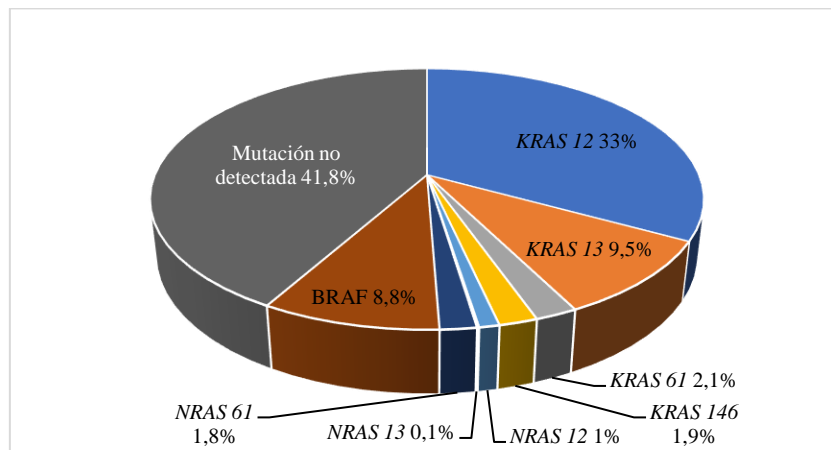


Figura 4. Cascadas de señalización de EGFR mediadas por RAS y RAF. La activación aberrante de estas rutas tiene como consecuencia un aumento de la proliferación y angiogénesis, alteración del metabolismo y disminución de la apoptosis (Normanno et al., 2009).

Se han identificado mutaciones en *RAS* en aproximadamente el 35-45% de los casos de CCR, de las cuales el 85% ocurren en *KRAS* y el 15% en *NRAS*. Las más frecuentes tienen lugar en los codones 12 y 13 del exón 2 (Normanno et al., 2009; Vincenzi et al., 2015). La mutación más común es el cambio de glicina por aspartato (G12D, G13D) seguida de la que produce un cambio

a valina (G12V). No obstante, también se han encontrado mutaciones con menor frecuencia en el exón 3 (codón 59 y 61) y en el exón 4 (codón 117 y 146) (Normanno et al., 2009; Vaughn et al., 2011).

*BRAF* es un oncogén que codifica para una serina/treonina quinasa presente en la ruta de señalización de MAPK, localizado por debajo de RAS. Las mutaciones del gen *BRAF* son menos frecuentes en el CCR, entre el 8% y 12% de los casos, y suelen ser excluyentes de las mutaciones en *RAS*. La mutación más frecuente en el CCR es V600E, cambio de valina a ácido glutámico (Normanno et al., 2009; Gil-Raga et al., 2018). La *Figura 5* muestra las frecuencias de las mutaciones en *RAS* y *BRAF* en el estudio del grupo de Vaughn en el que se analizaron 2.121 muestras de tumor de cáncer colorrectal.



**Figura 5. Frecuencia de las mutaciones detectadas en RAS y BRAF en una cohorte de 2.121 tumores de cáncer colorrectal.** Las mutaciones más frecuentes fueron KRAS 12 y 13 (42,5% de los casos). Se detectaron mutaciones en BRAF en el 8,8% de los casos. Además, se observan otras mutaciones en KRAS y NRAS detectadas con menor frecuencia (Vaughn et al., 2011).

#### **1.4. GENES RAS Y BRAF COMO BIOMARCADORES**

Existen evidencias de que *RAS* constituye un biomarcador predictivo negativo para el tratamiento anti-EGFR. En el estudio PRIME, en el que los pacientes recibieron de forma aleatoria Folfox4 o Folfox4 + Panitumumab, aquellos pacientes con mutaciones en *RAS* que recibieron la combinación anti-EGFR no respondieron a la terapia y la supervivencia libre de progresión fue menor, comparado con aquellos que recibieron solo Folfox4 (Douillard et al., 2014). Resultados similares se obtienen en el estudio CRYSTAL, en el que administró Folfiri con o sin Cetuximab (Van Cutsem et al., 2015). Estos estudios confirman que las mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de *RAS* (*KRAS* y *NRAS*) predicen una falta de respuesta a la terapia anti-EGFR, puesto que individuos con mutaciones en estos genes no se benefician de esta terapia. Por esta razón, es muy importante el análisis del estado mutacional de *RAS* para así poder seleccionar la terapia más adecuada para cada paciente (Van Cutsem et al., 2016).

Por otro lado, las mutaciones en *BRAF* representan un marcador pronóstico negativo para pacientes con CCR metastásico (CCRm) y por ello es importante evaluar la mutación V600E en *BRAF*. Además, también se asocian con la resistencia a la terapia anti-EGFR (Siravegna et al., 2015). El estado mutacional de *BRAF* debería determinarse en cada caso de CCR, preferiblemente durante el diagnóstico, pues representa un subtipo molecular y permite descartar el síndrome de Lynch, ya que raramente se encuentra mutado en estos casos (Thiel et al., 2013). Así pues, la determinación del estado mutacional de *RAS* y *BRAF* son claves para la selección en ensayos clínicos (Van Cutsem et al., 2016).

Con la aparición de nuevas tecnologías y herramientas está cobrando especial interés la biopsia líquida como muestra mínimamente invasiva para la búsqueda de biomarcadores y su monitorización en la selección de la terapia en CCR (Van Cutsem et al., 2016).

## **1.5. BIOPSIA LÍQUIDA**

El término de biopsia líquida hace referencia al análisis de biomarcadores tumorales aislados de fluidos corporales de pacientes con cáncer como son la sangre, la orina, el sudor, etc. (Yamada et al., 2018). Las muestras de sangre constituyen una fuente para analizar las células tumorales circulantes (CTCs), el ADN tumoral circulante (ADNtc), así como otros biomarcadores (microARNs, plaquetas, metabolitos del plasma o suero, exosomas) (Calabuig-Fariñas et al., 2016). El ADNtc, a día de hoy, es el más implementado en los laboratorios, ya que permite detectar diferentes tipos de alteraciones somáticas como mutaciones puntuales, amplificaciones, aneuploidías o metilaciones (Sefrioui et al., 2015; Cheng et al., 2016).

### **1.5.1. ADNtc**

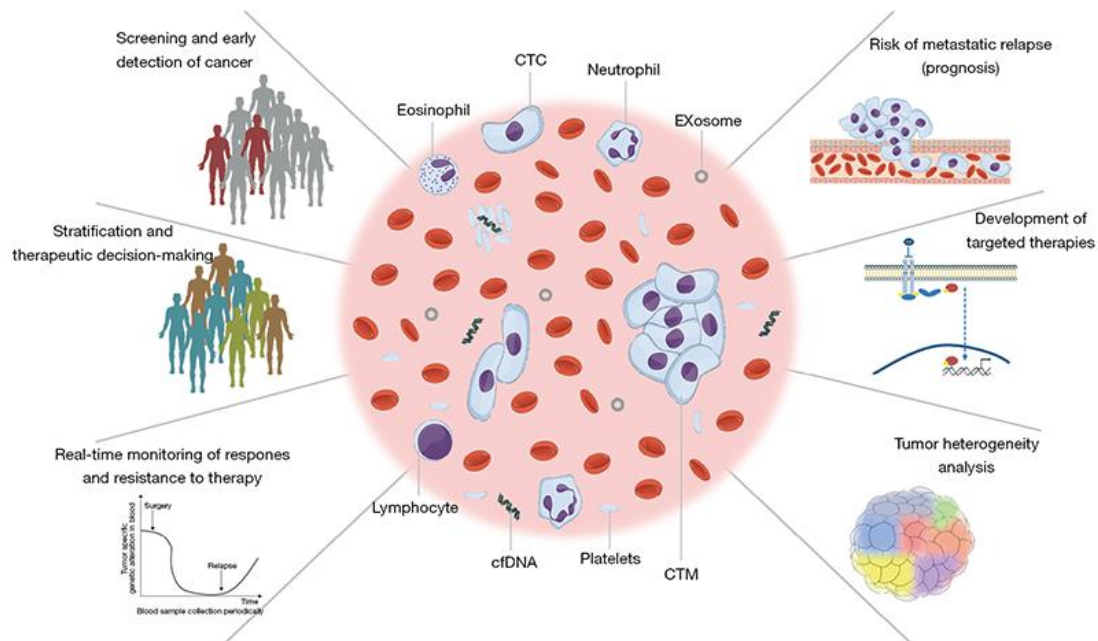
El ADN libre en circulación (ADNlc, del inglés “cell free” DNA-cfDNA) se refiere al ADN fragmentado extracelular, descrito por primera vez en 1948 (Mandel & Metais, 1948). El tamaño de los fragmentos del ADNlc se sitúa entre 150-180 pb, lo que se corresponde con un patrón de fragmentación característico de los procesos apoptóticos en el que se protege el fragmento de ADN alrededor del nucleosoma (Cheng et al., 2016; Calabuig-Fariñas et al., 2016).

El ADNtc es liberado por las células tumorales al torrente sanguíneo, por lo que alberga las mutaciones del tumor original (Cheng et al., 2016). Se han propuesto dos mecanismos de liberación del ADNtc: “pasivo” y “activo”. Por un lado, el mecanismo pasivo implica que las células tumorales apoptóticas y necróticas liberan su ADN fragmentado a la circulación. Por otro, los fragmentos de ADN tumoral también pueden ser liberados “activamente” por las células del tumor (Calabuig-Fariñas et al., 2016).

Aunque la función biológica del ADNtc no está clara, se piensa que su papel puede ser clave en el proceso metastásico a través de la transformación de células susceptibles. No obstante, se debe seguir investigando el papel pro-tumoral del ADNtc, así como el de una posible diana terapéutica. Es de gran relevancia destacar que el ADNtc forma parte del ADNlc y representa una fracción ínfima (0,01%) del total de ADN circulante. Por esta misma razón, se requieren tecnologías de elevada sensibilidad para poder detectarlo entre todo el ADN total circulante (Diaz & Bardelli, 2014; Alix-Panabières & Pantel, 2016; Calabuig-Fariñas et al., 2016).

### **1.5.2. Ventajas y aplicaciones clínicas**

Como hemos mencionado, la biopsia líquida representa una alternativa a la biopsia convencional ya que se trata de una técnica mínimamente invasiva; de elevada disponibilidad, pues en muchas ocasiones el tejido puede ser degradado o inaccesible; obteniendo una imagen de la heterogeneidad intra- e inter-molecular del tumor y es posible la monitorización de la evolución tumoral. Así pues, la información obtenida del análisis de la biopsia líquida puede ser empleada para el diagnóstico, pronóstico o como información predictiva, analizando la respuesta a un determinado tratamiento; así como para la detección mecanismos de resistencia o de enfermedad mínima residual (EMR) (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Calabuig-Fariñas et al., 2016; Yamada et al., 2018) (*Figura 6*).



**Figura 6. Características biológicas y clínicas de la biopsia líquida.** Se muestran los diferentes biomarcadores que se pueden analizar en sangre, así como el potencial clínico y aplicaciones en cáncer (Calabuig-Fariñas et al., 2016).

De esta manera, estudiando los cambios en los niveles de ADNtc es posible llevar a cabo un seguimiento de la respuesta al tratamiento e identificar las posibles resistencias, con el fin de seleccionar el tratamiento más adecuado, como es el caso de la detección de mutaciones en los genes *RAS*. Evidencias anteriores y estudios como el de Normanno y colaboradores muestran que al analizar *RAS* en biopsia líquida se obtienen resultados similares a los de biopsia de tejido en pacientes con CCRm que reciben un tratamiento de primera línea anti-EGFR con anticuerpos monoclonales (Sefrioui et al., 2015; Vidal et al., 2017; Normanno et al., 2018).

A pesar de que la biopsia líquida representa una herramienta muy útil en comparación con la biopsia convencional, la detección del ADNtc entre todo el ADNlc requiere técnicas ultrasensibles como es la PCR digital.

## **1.6. METODOLOGÍAS ULTRASENSIBLES BASADAS EN PCR DIGITAL**

La PCR digital (PCRd) es una técnica analítica que permite la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos basada en la amplificación de una única molécula. Esto es posible gracias a la compartimentalización de la muestra, de tal forma que tienen lugar miles de reacciones PCR en paralelo, permitiendo el multiplexado. La muestra inicial se diluye a una concentración tal que cada partición contenga una molécula (positivo) o ninguna (negativo). Las tecnologías basadas en PCR digital se caracterizan por su gran sensibilidad, precisión y reproducibilidad con respecto a otras tecnologías PCR ya que la compartimentalización de la muestra permite la amplificación y el análisis por separado, evitando así las variaciones en el proceso de amplificación. Además, proporciona la cuantificación absoluta sin necesidad de referencias (Hudecova, 2015; Cao et al., 2017).

Estas características y propiedades descritas anteriormente hacen esta técnica idónea para aplicaciones como detección de mutaciones en bajo porcentaje, cuantificación precisa de pequeñas alteraciones en el CNV, diferenciación entre cambios de expresión génica o evaluación del estado de metilación (Hudecova, 2015).

## PCR digital en emulsión (BEAMing)

La tecnología BEAMing (*Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics*), descrita por primera vez en 1999 por Vogelstein & Kinzler, consiste en una PCR digital que combina la amplificación en emulsión con partículas magnéticas y una citometría de flujo para lograr una detección de moléculas de ADNtc mutado con elevada sensibilidad (inferior al 0,01%) (Vogelstein & Kinzler, 1999), como se muestra en la *Figura 7*. El test OncoBEAM RAS CRC (Sysmex Inostics, Hamburgo, Alemania) cuenta con el marcado de Conformidad Europea (CE), lo que permite su uso en clínica para la determinación de mutaciones RAS en ADNtc para el diagnóstico *in vitro* (CE-IVD) (García-Foncillas et al., 2018). Este test de biopsia líquida detecta 34 mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de los genes *KRAS* y *NRAS* en pacientes con CCR, de acuerdo a las guías clínicas de Estados Unidos y Europa (Benson et al., 2014; Van Cutsem et al., 2016) que recomiendan la determinación de RAS antes de administrar una terapia anti-EGFR.

Technique	Sensitivity	Optimal Application
Sanger sequencing	> 10%	Tumor tissue
Pyrosequencing	10%	Tumor tissue
Next-generation sequencing	2%	Tumor tissue
Quantative PCR	1%	Tumor tissue
ARMS	0.10%	Tumor tissue
BEAMing, PAP, Digital PCR, TAM-Seq	0.01% or lower	ctDNA, rare variants in tumor tissue

**Figura 7. Metodologías para el análisis del ADNtc.** ARMS: Amplification Refractory Mutation System ; BEAMing: Beads, Emulsion, Amplification, Meagnetics; PAP: Pyrophosphorolysis-activated polymerization; TAM-Seq: Tagged-amplicon deep sequencing.

El estudio de García-Foncillas y colaboradores incluye la participación de diferentes hospitales españoles y muestra una gran correlación entre los resultados del estado mutacional de *KRAS* en biopsias tisulares y líquidas determinada por OncoBEAM, sugiriendo la aplicabilidad y viabilidad de este método para la elección del tratamiento adecuado, así como la detección de resistencias (García-Foncillas et al., 2018). Además, otros estudios también evidencian el éxito de emplear el sistema BEAMing para analizar mutaciones en *KRAS* y *NRAS* y conseguir un valor pronóstico (Vidal et al., 2017; Normanno et al., 2018).

En definitiva, diferentes estudios demuestran que los análisis de RAS en biopsia líquida son una herramienta eficiente y precisa para el uso en la práctica clínica habitual con varias aplicaciones en pacientes con CCRm, incluida la determinación de RAS basal en el momento del diagnóstico para decidir el tratamiento anti-EGFR, la evaluación de la eficacia del tratamiento y la aparición de mutaciones RAS como mecanismo de resistencia a la terapia anti-EGFR; siendo nuestro objetivo en el presente trabajo.



## 2. OBJETIVOS

El desarrollo y avance de nuevas tecnologías hace posible la determinación de diferentes biomarcadores a través de la biopsia líquida, una prueba mínimamente invasiva que ofrece información en tiempo real, incluso antes de que se dé una progresión clínica. Así pues, el objetivo principal del presente trabajo es analizar el estado mutacional de los genes *KRAS* y *NRAS* en pacientes de cáncer colorrectal metastásico mediante tecnologías basadas en PCR digital en biopsia líquida; así como determinar el estatus mutacional durante la evolución tumoral.

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Determinar las mutaciones en *RAS* (*KRAS* y *NRAS*) en biopsia líquida mediante la tecnología de PCR digital en una cohorte de pacientes con cáncer colorrectal metastásico.
2. Analizar las concordancias del estado mutacional de los genes *RAS* entre biopsia líquida y biopsia de tejido en pacientes con CCRm.
3. Monitorizar el estado mutacional de *RAS* durante la evolución clínica de los pacientes con CCRm mediante biopsia líquida.
4. Estudiar las correlaciones entre las alteraciones moleculares detectadas y las características clinicopatológicas.
5. Integrar los resultados y validar la utilidad de la biopsia líquida en CCRm.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **3.1. PACIENTES**

Este estudio se realizó con 25 pacientes de cáncer colorrectal metastásico en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV). Como criterio de selección se estableció que fueran pacientes con diagnóstico histológico de CCRm en estadios IV (de acuerdo con *The American Joint Comitte Cancer Staging* manual, 7ª edición). Todos los pacientes aceptaron participar voluntariamente en el estudio firmando el correspondiente consentimiento informado (Anexo I). Dicho estudio se llevó a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki y a los requisitos regulatorios a nivel nacional.

#### **3.2. OBTENCIÓN DEL PLASMA Y EXTRACCIÓN DE ADN**

Se recogieron 10 mL de sangre periférica de cada paciente en tubos STRECK o EDTA para la obtención del plasma. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1600 x g durante 10 minutos mediante un rotor de cubeta basculante para separar las fracciones de sangre. Se recoge el plasma y se centrifuga de nuevo a 6000 x g durante 10 minutos para eliminar cualquier resto celular presente en la muestra. El plasma se conserva a -80°C.

La extracción de ADNlc se llevó a cabo a partir de 3 mL de plasma mediante el kit QIAamp® Circulating Nucleic Acid (Qiagen, Hilden, Germany), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se cuantificó el ADNlc extraído mediante fluorometría con el Fluorómetro Qubit® (Life Technologies, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las muestras se almacenaron a -80°C.

#### **3.3. ANÁLISIS MUTACIONAL**

##### **3.3.1. Análisis del estado mutacional de los genes *RAS* en biopsia de tejido**

Las biopsias de tejido se analizan mediante pirosecuenciación empleando dos kits comerciales: “Therascreen® *KRAS* Pyro Kit” y “Therascreen® *RAS* Extension Pyro Kit” (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante para determinar las siguientes mutaciones: *KRAS* 12-13, *NRAS* 12-13, *NRAS* 61, *KRAS* 59-61, *KRAS* 11, *KRAS* 146, *NRAS* 58-59 y *NRAS* 146. El protocolo se basa en la inmovilización del ADN molde en sefarosa, amplificación por PCR y secuenciación. Los resultados se analizaron mediante el software PyroMark Q24 2.0.7 (Qiagen).

##### **3.3.2. Análisis del estado mutacional de los genes *RAS* en biopsia líquida**

El análisis del estado mutacional de *RAS* por la tecnología BEAMing se realiza con el kit comercial OncoBEAM™ *RAS* CRC CE-IVD de Sysmex®, permitiendo la detección de un alelo mutante entre 1.000 nativos. La *Figura 8* muestra los pasos a seguir de esta metodología, donde los procedimientos de aislamiento y preamplificación se realizan en el laboratorio pre-PCR mientras que el proceso experimental posterior tiene lugar en el laboratorio post-PCR, con el fin de evitar la contaminación cruzada.

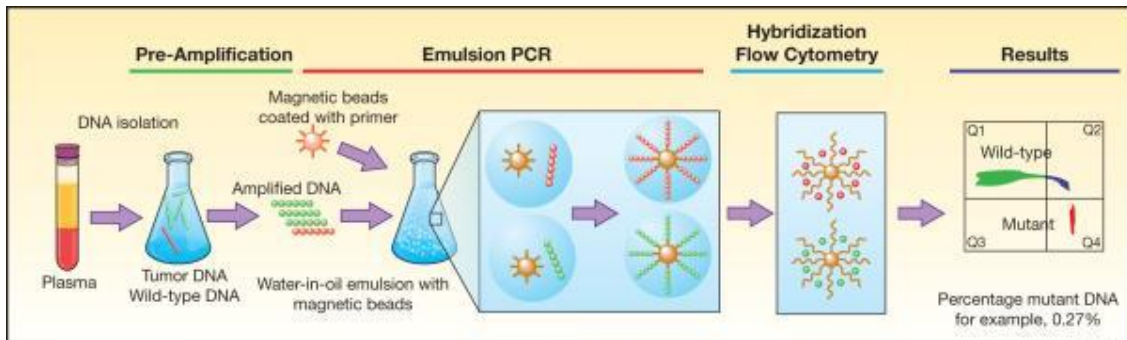


Figura 8. Flujo de trabajo de la tecnología BEAMing (Lauring & Park, 2011).

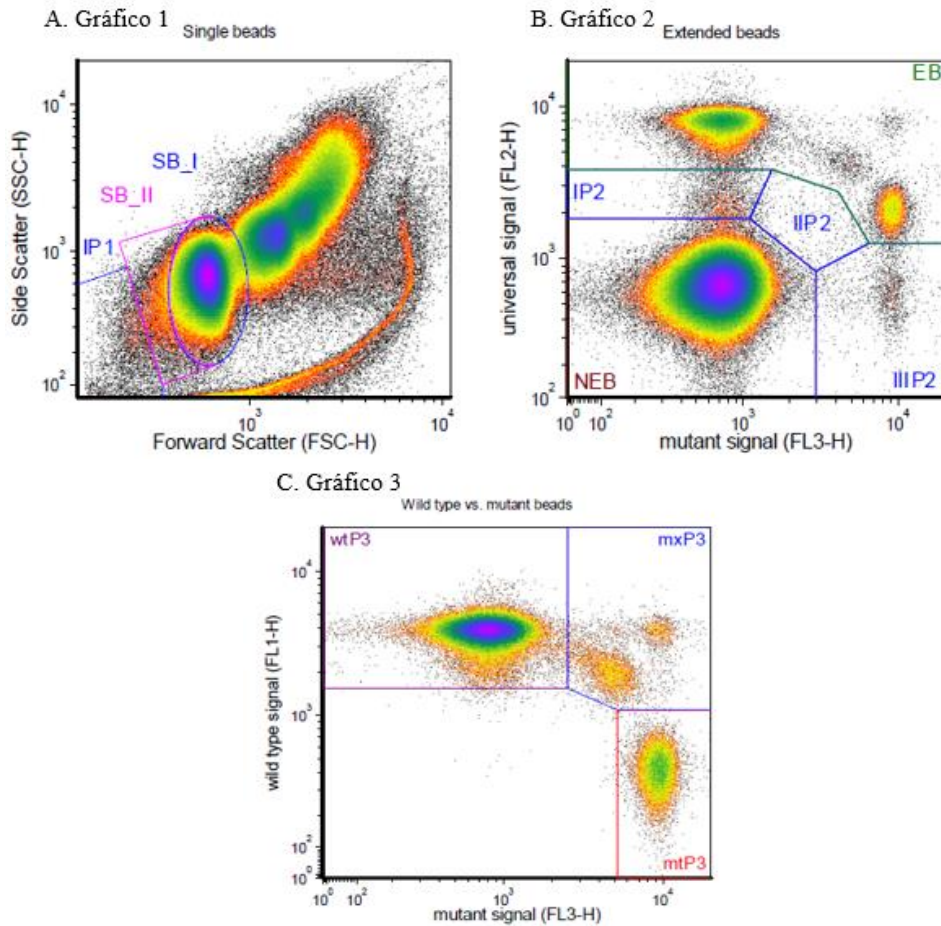
**1. Preamplificación:** La preamplificación de las mutaciones de *KRAS* y *NRAS* en los exones 2, 3 y 4 (Anexo II) se realiza en una PCR múltiple (PCRm). La muestra de ADN se diluyó a una concentración específica para cada codón, según el protocolo del fabricante.

**2. PCR en emulsión (PCREm):** las muestras de ADN diluido se transfieren a la placa de PCR de emulsión, junto con las mezclas de trabajo de emulsión (una para cada codón). Se añade la solución EmulsiFIRE para inducir la emulsión, creando millones de compartimentos de PCR (gotitas hidrofóbicas con una sola bolita magnética *-bead-* en el interior) en una sola reacción.

**3. Hibridación:** tras la PCREm, miles de copias de fragmentos de ADN idénticos cubren cada gota. Posteriormente, se rompe la emulsión para hibridar el ADN molde con las sondas específicas marcadas. Tras la hibridación, se realizan varios lavados para eliminar las hebras no hibridadas.

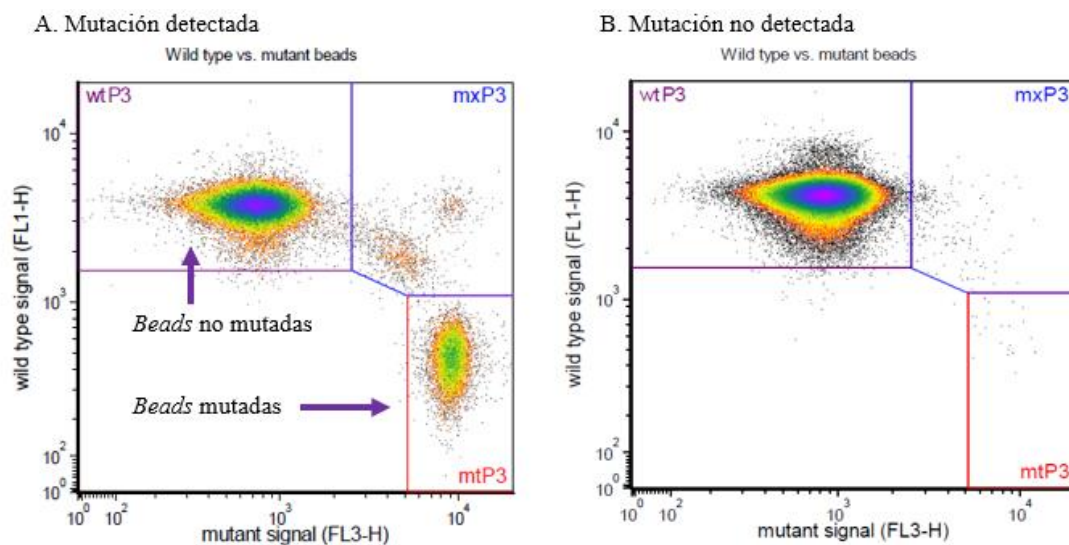
**4. Citometría de flujo:** el paso final comprende un análisis de citometría de flujo de las *beads* marcadas con el citómetro de flujo Cube6i (Sysmex®). El software tiene en cuenta diferentes parámetros y ratios para realizar los cálculos y el análisis (Anexo III). Algunos de estos parámetros hacen referencia a la posición de las *beads*, de las *beads* extendidas (*beads* detectadas por una sonda universal, independientemente del estado mutacional), de las *beads* extendidas con sonda no mutada y sonda mutada, número total de *beads* extendidas con sonda mutada, así como el porcentaje de *beads* mutadas con respecto al total de *beads* extendidas (referido como la fracción mutante, FM), entre otros.

Según la posición de las *beads* y las intensidades de fluorescencia se pueden hallar los diferentes tipos de poblaciones (mutados y no mutados) y la proporción de mutación (Fracción alélica Mutante, FM). Durante el análisis, se generan tres gráficos (*Plot 1, 2 y 3*) en los que se puede observar la distribución y proporción de *beads* (Figura 9). El primer gráfico separa las poblaciones de *beads* en función de si se encuentran solas (individuales, SB\_II) o asociadas (SB\_I) en dobletes, tripletes, etc. Seguidamente, las *beads* individuales se separan en el segundo gráfico según contengan producto de PCR, es decir, las *beads* extendidas (cuadrante superior, EB) o no extendidas (cuadrante inferior, NEB). Por último, las *beads* extendidas se separan en el tercer gráfico en función de si se detecta la sonda no mutada (cuadrante superior izquierdo, wtP3), mutada (cuadrante inferior derecho (mtP3) o mixto, en el que las *beads* tienen tanto sonda no mutada como mutada (cuadrante superior derecho, mxP3).



**Figura 9.** Ejemplos de los tres gráficos obtenidos tras el análisis por BEAMing. En cada gráfico se muestra la distribución y proporción de las beads individuales o asociadas (A), de las extendidas y no extendidas (B) y de las beads detectadas con sonda no mutada o mutada (C).

Finalmente, teniendo en cuenta estos parámetros y en base a los umbrales de detección positiva (*cutoffs*) establecidos para cada codón (Anexo III), el software da un resultado negativo o positivo. La *Figura 10* muestra un ejemplo de la distribución de las diferentes poblaciones de *beads* extendidas tras el análisis por BEAMing.



**Figura 10.** Ejemplos del tercer gráfico obtenidos tras el análisis por BEAMing. A: ejemplo en el que se detecta una mutación; B: ejemplo de mutación no detectada.

### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

#### **3.5.1. Estudio de concordancia**

Las concordancias y discordancias entre las muestras de tejido y plasma se analizaron mediante el índice Kappa de Cohen, empleando las ecuaciones que se muestran en la *Tabla 1*.

*Tabla 1. Análisis de concordancia entre tejido y biopsia líquida (Cohen, 1960).*

		Biopsia tisular		
		MUTADOS	NO MUTADOS	TOTAL
Biopsia líquida	MUTADOS	a	b	a + b
	NO MUTADOS	c	d	c + d
	TOTAL	a + c	b + d	n

$$\text{Concordancia general (\%)}: \frac{a+d}{n} \times 100$$

$$\text{Concordancia positiva (\%)}: \frac{a}{a+c} \times 100$$

$$\text{Concordancia negativa (\%)}: \frac{d}{b+d} \times 100$$

#### **3.5.2. Análisis de las variables**

Los análisis estadísticos entre el estado mutacional de *RAS* y las variables clinicopatológicas se llevaron a cabo mediante pruebas no paramétricas (Mann-Whitney U y Kruskal Wallis). El análisis de supervivencia se realizó empleando el método no paramétrico de Kaplan-Meier y la significación estadística entre las curvas de supervivencia se evaluó mediante la prueba de log-rank. Se calculó la supervivencia libre de progresión (SLP), entendida como el tiempo desde el diagnóstico de enfermedad metastásica hasta la progresión de la enfermedad, y supervivencia global (SG), entendida como el tiempo desde el diagnóstico de enfermedad metastásica hasta el momento de exitus.

Para todos los análisis, los valores de p-bilaterales <0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) versión 15.0 (Chicago, IL).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA COHORTE DE ESTUDIO

Este estudio incluyó 25 pacientes con cáncer colorrectal metastásico del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Las características clinicopatológicas destacan que la mediana de edad de nuestra cohorte se encuentra en 63 años, con un rango de 40-81 años, el 68% está representado por hombres, siendo la histología de adenocarcinoma la presente en todos ellos; y las metástasis más frecuentes se localizan en el hígado (52%), seguido de las de pulmón (20%). El resto de las características se muestran en la *Tabla 2*.

*Tabla 2. Características clinicopatológicas de la cohorte de estudio.*

Características clinicopatológicas		Nº. pacientes (n=25)
<b>Edad</b>	Mediana [rango]	63 [40-81]
<b>Sexo</b>	Hombre	17 (68%)
	Mujer	8 (32%)
<b>Tipo histológico</b>	Adenocarcinoma	25 (100%)
<b>Tamaño tumor primario (cm)</b>	Mediana [rango]	4 [1,9-9,5]
<b>Localización tumor primario</b>	Colon derecho	3 (12%)
	Colon izquierdo	1 (4%)
	Recto-sigma	21 (84%)
<b>Localización metástasis</b>	Hígado	13 (52%)
	Pulmón	5 (20%)
	Peritoneo	2 (8%)
	Varios Órganos	5 (20%)
<b>Progresión</b>	No	12 (48%)
	Sí	13 (52%)
<b>Exitus</b>	No	15 (60%)
	Sí	10 (40%)

### 4.2. ESTADO MUTACIONAL DE LOS GENES RAS

#### 4.2.1. Biopsia de tejido

El análisis del estado mutacional de *RAS* se realizó en los 25 pacientes mediante pirosecuenciación, considerándose como mutado aquellos casos en los que el umbral de la fracción mutante es superior al 5%. Se analizaron 15 casos en los que no se detectó mutación (60%) y 10 casos mutados (40%). De estos últimos, se identificaron 9 casos con mutaciones en *KRAS* (36%) y 1 caso en *NRAS* (4%). Cabe destacar que en los casos en los que no se detectó ninguna mutación no se identificaron mutaciones en *BRAF*.

Las mutaciones en *KRAS* más frecuentes se localizan en el exón 2 codón 12 (28%) y en el exón 3 codón 61 (4%). En cuanto al cambio aminoacídico, tal y como recoge la literatura, la mutación más frecuente encontrada en nuestros pacientes mutados en *KRAS* fue el cambio de glicina por

aspártico en el codón 12 (G12D), en un 12% de los casos. Otros cambios identificados en el codón 12 fueron glicina por alanina (G12A) en un 8% de los casos, por valina (G12V) en un paciente y cambio a arginina (G12R) en otro. La mutación detectada en el codón 61 fue el cambio de glutamina a arginina (Q61R). En uno de los pacientes se determinó una doble mutación en *KRAS* en el exón 2 codón 12 (G12D) y en el exón 4 codón 117 (K117N). En el gen *NRAS* se localizó en el exón 2 codón 13 una sustitución de glicina por arginina (G13R). En la *Tabla 3* recoge un resumen de las mutaciones en nuestra población o cohorte de estudio.

*Tabla 3. Descripción de las mutaciones descritas en la cohorte de 25 pacientes.*

	Casos	% (n=25)
<b>No mutado (nativo)</b>	15	60%
<b>Mutado</b>	10	40%
<i>KRAS</i>	9	36%
<i>NRAS</i>	1	4%
<b>Mutaciones por exón-codón</b>		
<b><i>KRAS</i></b>		
<b>Exón 2 codón 12</b>	<b>7</b>	<b>28%</b>
G12D	3	12%
G12A	2	8%
G12V	1	4%
G12R	1	4%
<b>Exón 3 codón 61 (Q61R)</b>	<b>1</b>	<b>4%</b>
<b>Exón 2 codón 12 (G12D) + exón 4 codón 117 (K117N)</b>	<b>1</b>	<b>4%</b>
<b><i>NRAS</i></b>		
<b>Exón 2 codón 13 (G13R)</b>	<b>1</b>	<b>4%</b>

En la literatura, los cambios más frecuentes se localizan en el exón 2 de *KRAS*. En el estudio de Jo y colaboradores, en el que analizaron las muestras de tumor por pirosecuenciación, se obtienen resultados similares a los obtenidos en nuestra cohorte; detectando mutaciones en el 42,6% de los casos, siendo la más común la mutación *KRAS* G12D, seguido de G12V, G12A y G13D (Jo et al., 2016). Por el contrario, en otro estudio en el que también se empleó la pirosecuenciación para el análisis, se identificaron mutaciones en el exón 2 de *KRAS* en el 85% de los casos mutados; siendo la más común la mutación G12V, seguido de G12D, G12S y G13D. En consonancia con nuestros resultados, el 7,2% de los casos mutados se identificaron alteraciones en *NRAS*, siendo la más frecuente *NRAS* Q61H (Jouini et al., 2019).

### 4.2.2. Biopsia líquida

El laboratorio de oncología de la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV) cuenta con dos tecnologías de PCR digital para el análisis en biopsia líquida. Una de ellas es el sistema BEAMing, comentado anteriormente, y la otra es una tecnología de ThermoFisher que actualmente está siendo validada mediante ensayos para su puesta a punto e implementación en la práctica clínica. Por este motivo y, dado que la metodología BEAMing cuenta con el marcado CE para el diagnóstico *in vitro*, por lo que se encuentra muy bien consolidada para el análisis en biopsia líquida, ha sido la metodología empleada para el análisis de las mutaciones en los genes *RAS* en el presente trabajo.

En primer lugar, aunque la biopsia líquida cada vez se está introduciendo más en la práctica clínica, es necesario establecer un protocolo optimizado para el análisis del ADNlc, sobre todo en lo referido a la fase preanalítica, que incluye pasos como la extracción de sangre, transporte, almacenamiento, procesamiento del plasma o extracción de ADN (Medina Diaz et al., 2016).

El ADNlc se puede extraer tanto del plasma como del suero, pero se recomienda emplear el plasma como principal fuente de ADNlc. Esto es así porque en el suero, debido a la lisis celular, la contaminación por ADN genómico es mayor, lo que puede ejercer un impacto en los niveles relativos de ADNlc (Vymetalkova et al., 2018). El procesamiento de la muestra sanguínea en nuestro estudio se realizó en las dos horas siguientes a su recolección, ya que la estabilidad del ADNlc se ve comprometida por la actividad DNasa y por la liberación de ADN por parte de las células sanguíneas (Medina Diaz et al., 2016; Vymetalkova et al., 2018). Otro factor clave es la temperatura de procesamiento y almacenamiento, pues desempeña un papel muy influyente en la calidad y volumen del plasma. Al trabajar con temperaturas extremas (tanto altas como bajas), se produce un incremento en los niveles de ADN genómico debido a la lisis celular (Medina Diaz et al., 2016).

En el laboratorio se recogieron las muestras de sangre en tubos con EDTA y en tubos STRECK y, aunque se obtienen resultados similares independientemente del tubo de recolección, para periodos de almacenamiento más largos se recomienda emplear tubos STRECK. Esto es debido a que contienen un preservante que impide la lisis celular y que favorece la estabilidad del ADNlc a temperatura ambiente (6-37°C recomendando por el fabricante) (Medina Diaz et al., 2016).

En cuanto al análisis en nuestra cohorte, la concentración de ADNlc de la determinación basal en las diferentes muestras osciló entre 0,132 y 7,2 ng/μl, siendo la mediana 0,376 ng/μl. Se detectaron 15 casos no mutados (60%) y 10 casos mutados (40%), de los cuales en 9 pacientes se detectaron mutaciones en *KRAS* (36%) y en 1 paciente en *NRAS* (4%). Las fracciones mutantes en los casos *RAS* mutados obtenidas oscilan entre 0,055% y 34,009% con una mediana de 1,01%, y algunos de ellos serán comentados en mayor detalle a continuación.

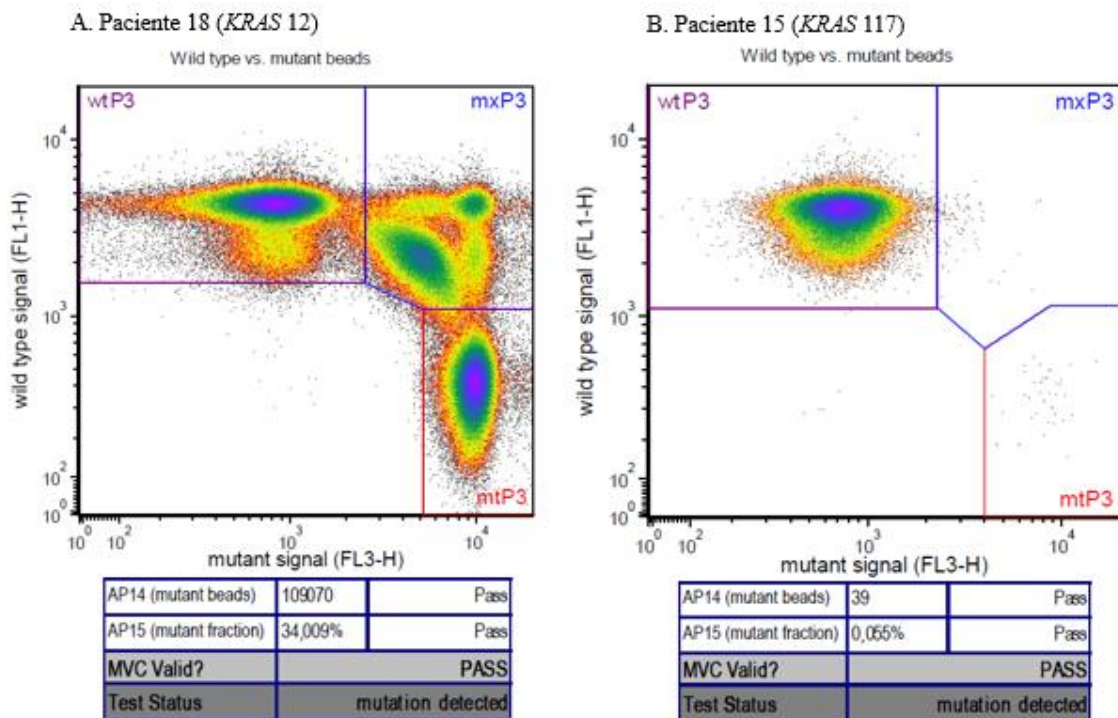
Las mutaciones más frecuentes en *KRAS* se identificaron en el codón 12 del exón 2 en el 24% de los casos, seguido de cambios en el codón 117 del exón 4 en un 8% de los casos. También se detectó una mutación en el codón 61 del exón 3 en un paciente (4%). En *NRAS* se determinó una mutación en un paciente en el codón 13 del exón 2 (4%) (Tabla 4).



Tabla 4. Frecuencia de las mutaciones en KRAS y NRAS en la cohorte, determinado por la metodología de BEAMing.

	Casos	% (n=25)
<b>No mutado (nativo)</b>	15	60%
<b>Mutado</b>	10	40%
<i>KRAS</i>	9	36%
<i>NRAS</i>	1	4%
FM (%)	mediana [rango]	1,01 [0,055-34,009]
<b>Mutaciones por exón-codón</b>		
<b><i>KRAS</i></b>		
Exón 2 codón 12	6	24%
Exón 3 codón 61	1	4%
Exón 4 codón 117	2	8%
<b><i>NRAS</i></b>		
Exón 2 codón 13	1	4%

Dentro de la cohorte de pacientes analizados, en los siguientes apartados se detallarán algunos de los casos. Por ejemplo, en la *Figura 11* se muestran dos casos opuestos con una fracción mutante muy elevada y otra muy baja. En el caso 18 (*Figura 11A*) se detecta una mutación en *KRAS* 12 con una fracción mutante de 34,009% y 109.070 *beads* mutadas, un valor muy superior al *cutoff* para dicha mutación, establecido en 40 *beads* mutadas. Por otro lado, el paciente 15, mutado en *KRAS* 117 presenta una fracción mutante de 0,055% con 39 *beads* mutadas, apenas un poco superior al *cutoff*, establecido en 36 *beads* mutadas (*Figura 11B*). Estos casos serán explicados en mayor detalle a lo largo de los siguientes apartados.



*Figura 11. Resultados de la determinación de RAS por BEAMing en pacientes con CCRm. A: mutación KRAS 12 detectada en el tumor del paciente 18 (109.070 beads mutadas y FM=34,009%); B: mutación KRAS 117 detectada en el tumor del paciente 15 (39 beads mutadas y FM=0,055%).*

### 4.2.3. Análisis de concordancia: tejido vs. ADNtc

Las determinaciones del estado mutacional de *RAS* en tejido y plasma de la cohorte se comentarán a continuación y se encuentran recogidas en la *Tabla 5*.

*Tabla 5. Resumen de las determinaciones en tejido y plasma de RAS en nuestra cohorte. Asimismo, se muestra la concentración de ADNtc (ng/μl), el número de beads mutadas y la fracción mutante (%).*

Caso	Tejido	Plasma			
	Estado RAS	Estado RAS	[ADNtc] (ng/μl)	Beads mutadas	FM
1	ND	ND	0,362		
2	<i>KRAS</i> Q61R	<i>KRAS</i> 61	0,31	97	0,62%
3	ND	ND	0,306		
4	ND	ND	0,456		
5	<i>KRAS</i> G12A	<i>KRAS</i> 12	0,32	60	0,21%
6	<i>KRAS</i> G12D	<i>KRAS</i> 12	0,208	2.586	8,21%
7	ND	ND	4,47		
8	ND	ND	4,96		
9	<i>KRAS</i> G12D	<i>KRAS</i> 12	0,874	10.863	11,46%
10	ND	ND	0,52		
11	<i>KRAS</i> G12D	<i>KRAS</i> 12	0,322	832	1,20%
12	ND	ND	0,484		
13	ND	ND	0,754		
14	<i>KRAS</i> G12V	ND	0,408		
15	ND	<i>KRAS</i> 117	0,376	39	0,055%
16	ND	ND	0,538		
17	ND	ND	0,322		
18	<i>KRAS</i> G12R	<i>KRAS</i> 12	1,09	109.070	34,009%
19	ND	ND	0,132		
20	<i>KRAS</i> G12A	<i>KRAS</i> 12	0,352	515	0,59%
21	ND	ND	0,308		
22	ND	ND	0,299		
23	<i>KRAS</i> G12D <i>KRAS</i> K117N	<i>KRAS</i> 117	0,956	773	2,81%
24	ND	ND	7,2		
25	<i>NRAS</i> G13R	<i>NRAS</i> 13	0,411	571	1,011%

\*ND: No Detectable

FM: fracción alélica mutante (%)

Se realizó una comparativa de los resultados obtenidos en los análisis de tejido y plasma para estudiar el grado de concordancia. En primer lugar, se compararon los porcentajes de casos mutados y no mutados obtenidos tras ambos análisis, observándose los mismos porcentajes en casos en los que no se detecta mutación (60% en tejido y plasma) y en los mutados (40% en tejido y plasma). Por otro lado, se realizó un análisis de concordancia entre los resultados obtenidos en tejido y plasma mediante el índice Kappa de Cohen (Cohen, 1960), calculando además la concordancia general, positiva y negativa (*Tabla 6*).

Tabla 6. Concordancia de los casos mutados y no mutados en biopsia líquida y tisular.

Biopsia líquida	Biopsia tisular			
		MUTADOS	NO MUTADOS	TOTAL
MUTADOS		9	1	10
NO MUTADOS		1	14	15
TOTAL		10	15	25

Concordancia general: 92%

Concordancia positiva: 90%

Concordancia negativa: 93,3%

Estos resultados muestran una muy buena concordancia (índice Kappa=0,833; p-value<0,0001) con una concordancia general de 92%, además de una concordancia positiva de 90% y concordancia negativa de 93,3%. El grado de concordancia es del mismo orden que los obtenidos por otros autores, como es el estudio de un grupo español que obtuvo una concordancia general del 89%, concordancia positiva del 86,3% y concordancia negativa del 92,4% al realizar la comparativa en 236 pacientes de diferentes hospitales españoles, empleando la tecnología BEAMing. No obstante, tras reanalizar las muestras tisulares con BEAMing, una tecnología más sensible, obtuvieron un grado de concordancia igual que en nuestro estudio, del 92% (García-Foncillas et al., 2018). Por otro lado, el grupo de Sefrioui también obtiene un resultado similar analizando las muestras de plasma mediante una aproximación de PCR digital como es la QuantStudio™ 3D Digital PCR, con un valor de concordancia de 85% (Sefrioui et al., 2015). Las diferencias en el grado de concordancia pueden deberse a la sensibilidad de las técnicas de análisis, ya que la metodología BEAMing presenta mayor sensibilidad (inferior al 0,01%) que la PCR digital empleada en el estudio del grupo de Sefrioui. En definitiva, nuestro estudio y el de otros grupos demuestran la viabilidad y aplicabilidad del análisis en biopsia líquida, siempre que la sensibilidad de la tecnología empleada sea la adecuada.

Existen dos casos discordantes que se reflejan en la *Tabla 7*. Estas diferencias pueden deberse a la heterogeneidad intratumoral o a la variabilidad de las técnicas empleadas para los análisis (Grasselli et al., 2017). Es de gran importancia en este contexto que el análisis en biopsia líquida y tisular sean los más similares posible en el tiempo porque si se realiza tras la cirugía o tratamiento no pueden ser comparables. Esto se debe a que al extirpar el tumor, no hay células tumorales que secreten su ADN al torrente sanguíneo, por lo que se dificulta la determinación (Reinert et al., 2016; Montagut et al., 2018). Asimismo, con el tratamiento se altera el perfil molecular del tumor debido a la evolución y selección clonal, además de que disminuyen los niveles de ADNtc, dificultando su detección (Siravegna et al., 2015). Se detallan estos casos a continuación.

Tabla 7. Diferencias entre las muestras de tejido tumoral y plasma.

Caso	Tejido	Plasma
14	KRAS G12V	ND
15	ND	KRAS 117

\*ND: No Detectable

En primer lugar, el paciente 14 presenta mutación en tejido pero no se pudo detectar en plasma debido a la baja cantidad de ADN. Esto podría deberse a que el paciente presenta dos metástasis focalizadas y, probablemente, por el pequeño tamaño de estas, no hay suficiente cantidad de ADN para poder detectar la mutación, ya que está demostrado la relación de la carga tumoral con la

liberación de ADN al torrente sanguíneo (Diaz & Bardelli, 2014; Siravegna et al., 2015; El Messaoudi et al., 2016). En casos en los que en tejido no se detecta mutación pero sí en plasma, como el caso del paciente 15, se puede deber a la heterogeneidad de los clones en el tumor primario y/o metástasis, los cuales no se encuentran representados en la muestra de tejido pero con la biopsia líquida es posible su detección (Siravegna et al., 2015). No obstante, es destacable que en este paciente se determinó la mutación en el límite de detección, con una fracción mutante muy baja y un número de *beads* mutadas que apenas era superior al *cutoff* establecido en 36 *beads*, y en este caso se detectaron 39. Por otro lado, la sensibilidad de las técnicas empleadas para el análisis en tejido y plasma no es la misma, puesto que las muestras de tejido se analizaron mediante pirosecuenciación con una sensibilidad del 5% y las muestras de plasma mediante BEAMing, con una sensibilidad del 0,01% o inferior. Además, en estos casos en los que se detecta una proporción de mutación tan baja es necesario evaluar hasta qué punto esos resultados son representativos del tumor y cómo se interpreta esa información a la hora de decidir un tratamiento u otro (Montagut et al., 2018).

Cabe mencionar el caso 23 donde en la biopsia tisular se detectó una doble mutación (*KRAS* G12D y *KRAS* K117N), sin embargo, en la biopsia líquida solo se identificó la mutación correspondiente al codón 117. Este hecho puede deberse a la heterogeneidad clonal que está presente en la evolución tumoral, de tal forma que en este caso posiblemente estamos detectando los clones predominantes en sangre (*KRAS* 117) (Figura 12).

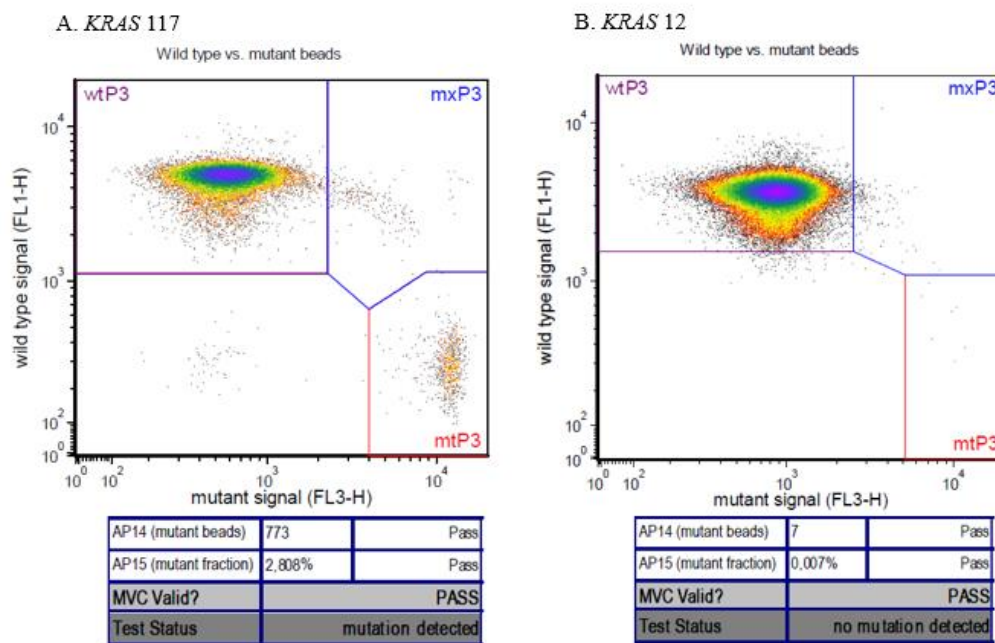


Figura 12. Resultados del análisis por la metodología BEAMing en el paciente 23. A: mutación detectada en *KRAS* 117; B: mutación no detectada en *KRAS* 12.

### **4.3. CORRELACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DE RAS CON LAS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS**

Se estudió la correlación entre el estado mutacional de *RAS* determinado por biopsia líquida y tisular y las variables clinicopatológicas mediante las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney U y Kruskal-Wallis, con el fin de ver las diferencias entre pacientes que presentan mutaciones en *RAS* en el tumor y los que no. No se encontró ninguna asociación ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre el estado mutacional de *RAS* y las diferentes variables clinicopatológicas: edad, sexo, tamaño del tumor primario (cm), localización del tumor primario, localización de las metástasis, resección del tumor primario, progresión al tratamiento y exitus.

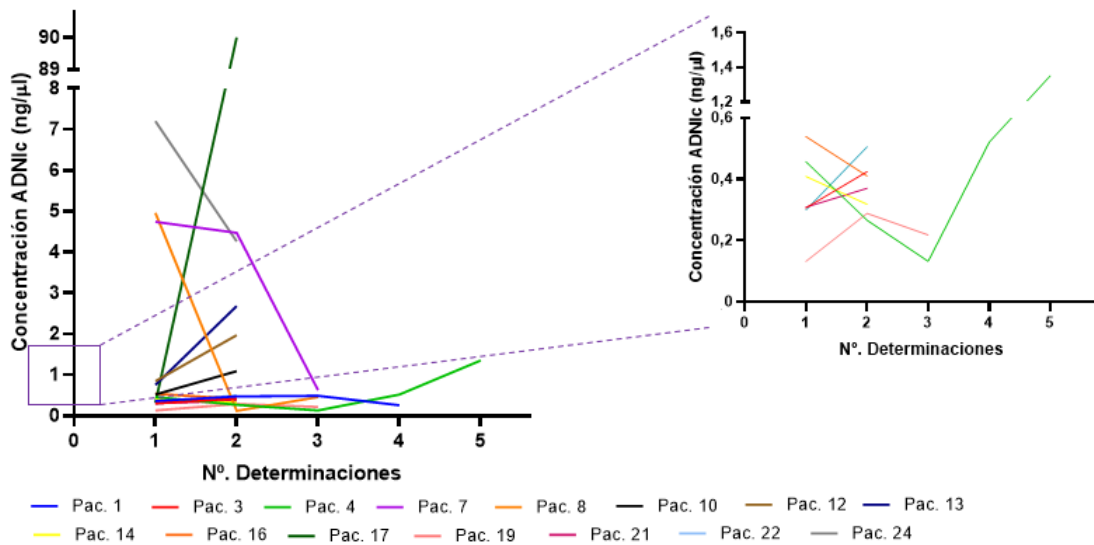
En otros estudios se han encontrado asociaciones significativas con algunas de estas variables clinicopatológicas. Por ejemplo, estudios señalan la asociación del estado mutacional de los genes *RAS* con el sexo, siendo las mutaciones en *RAS* más frecuentes en mujeres (Levi et al., 2018; Isnaldi et al., 2019). Por otro lado, Modest y colaboradores señalaron la asociación entre las mutaciones en el exón 2 de *KRAS* y la presencia de metástasis hepáticas y pulmonares (Modest et al., 2011). Asimismo, Vidal y colaboradores también observaron diferencias en la proporción de mutaciones dependiendo de la localización de las metástasis, encontrándose mayores niveles en las hepáticas ( $p\text{-value}=0,001$ ), mientras que las fracciones mutantes más bajas se localizan en metástasis peritoneales y pulmonares únicas (Vidal et al., 2017).

### **4.4. MONITORIZACIÓN DE PACIENTES MEDIANTE BIOPSIA LÍQUIDA**

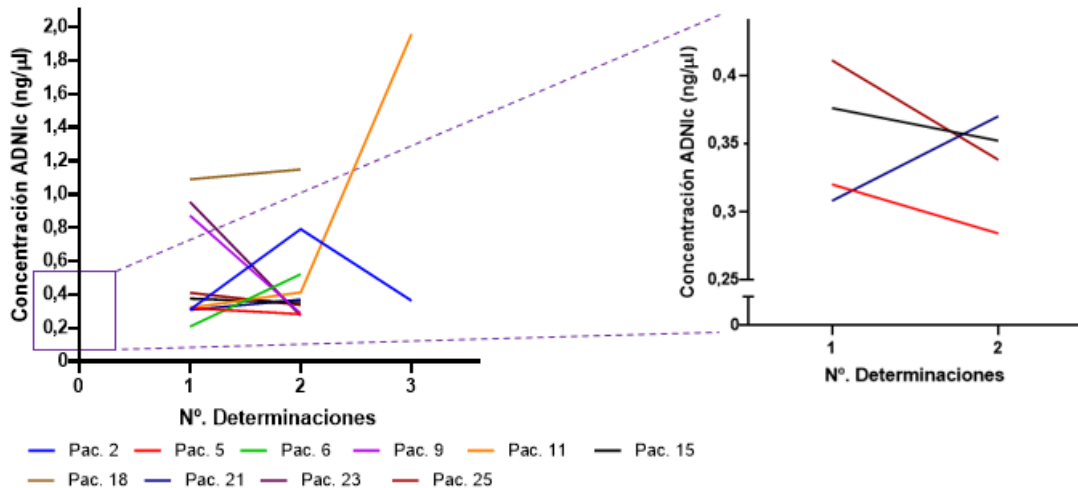
La determinación de las posibles alteraciones moleculares del tumor no solo es importante en el momento del diagnóstico, sino que para una correcta selección del tratamiento en la evolución tumoral es necesario monitorizar los pacientes con el fin de observar la plasticidad y heterogeneidad tumoral responsable de los mecanismos de resistencias y progresión (Vidal et al., 2017; Thomsen et al., 2018).

En nuestra cohorte de pacientes se realizó un seguimiento del estado mutacional de los genes *RAS* (*KRAS* y *NRAS*) en el momento inicial en el diagnóstico, pero también durante la evolución de la enfermedad a través de los análisis de las muestras de plasma mediante la metodología BEAMing, ya que el estado de *RAS* es determinante a la hora de seleccionar un tratamiento, como se ha mencionado anteriormente. Como se ha comentado en los apartados anteriores, en la determinación basal hay 15 casos en los que no se detectó mutación y 10 pacientes mutados. Los cambios dinámicos observados en los niveles de ADNlc en las diferentes determinaciones sanguíneas de los pacientes pueden indicar cambios que se están produciendo en la evolución tumoral (Figura 13), así como en la proporción de ADNtc, determinado por la detección de mutaciones en *RAS* en el momento del diagnóstico y durante la monitorización.

## A. Pacientes con mutaciones no detectadas en la determinación basal



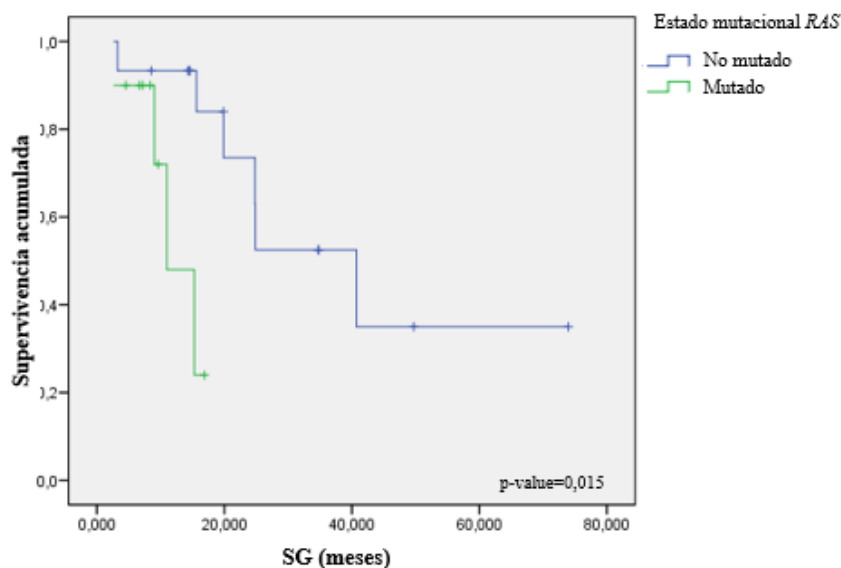
## B. Pacientes con mutaciones detectadas en la determinación basal



**Figura 13. Niveles de ADNlc (ng/μl) de los pacientes de la cohorte durante la determinación basal en plasma por la metodología de BEAMing. A: pacientes en los que no se detectó mutación en la determinación basal, a la derecha se muestra una ampliación de la parte inferior de la gráfica; B: pacientes en los que se detectó mutación en la determinación basal, a la derecha se muestra una ampliación de la parte inferior de la gráfica Pac.: paciente.**

Se ha descrito la correlación entre el aumento de los niveles de ADNlc y la disminución de la supervivencia, debido a que es un indicador del posible aumento del tumor y metástasis y, por tanto, mayor segregación de ADNlc (*shedding*) (Diaz & Bardelli, 2014; El Messaoudi et al., 2016). A pesar de esto, en nuestra cohorte no se observa ninguna asociación significativa de la concentración de ADNlc con respecto a la SG y SLP (p-value=0,17, p-value=0,511). Otros autores sí que han señalado el impacto de los niveles de ADNlc en la supervivencia global, la cual disminuye conforme aumenta la concentración de ADNlc (Sefrioui et al., 2015; El Messaoudi et al., 2016). Cabe mencionar que el incremento en la concentración de ADNlc no tiene por qué deberse únicamente al proceso tumorigénico, sino que puede producirse por otros procesos como inflamación o trauma (El Messaoudi et al., 2016); por ello, resulta de gran interés analizar el ADNlc, ya que alberga las alteraciones del tumor.

Asimismo, se observó un impacto significativo en cuanto al estado de *RAS* (mutado o no mutado) en la supervivencia global ( $p\text{-value}=0,015$ ), la cual es menor en pacientes que presentan mutaciones en los genes *RAS*. Los pacientes en los que no se detectan mutaciones alcanzan una mediana de 42 meses, frente a los 12,2 meses de los pacientes mutados (*Figura 14*). Este supuesto también se refleja en la influencia de la fracción mutante en la progresión de la enfermedad, ya que se observa una diferencia significativa entre pacientes con una elevada fracción mutante y aquellos con baja proporción de mutación, los cuales presentan una SLP mayor. No obstante, dado el pequeño tamaño de nuestra cohorte estos resultados necesitarían una validación con un mayor número de casos ( $p\text{-value}=0,04$ ). Estos resultados coinciden con lo publicado por otros autores, que señalan el valor pronóstico de las mutaciones en los genes *RAS*, en los que se observa una disminución en la supervivencia global y libre de progresión en pacientes que presentaban mutaciones en *RAS* (Lecomte et al., 2002; Vincenzi et al., 2015; Vidal et al., 2017; Thomsen et al., 2018; Takayama et al., 2018). En el estudio RASCAL II, que realizó un meta-análisis en el que participaron 3.439 pacientes de 42 centros diferentes, se demostró que la mutación *KRAS* G12V disminuye significativamente la supervivencia libre de progresión y global (Andreyev et al., 2001).

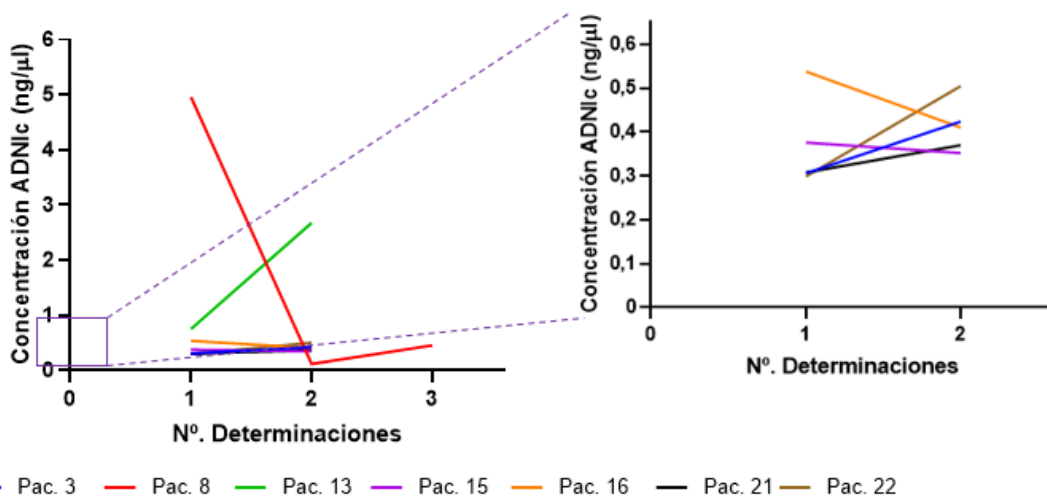


**Figura 14.** Gráfico de supervivencia global de nuestra cohorte. Se observa una diferencia significativa ( $p\text{-value}=0,015$ ) entre pacientes mutados y no mutados, ya que estos alcanzan mediana de 12,2 meses de supervivencia frente a los 42 meses de los pacientes que no presentan mutaciones en los genes *RAS*.

En la literatura se ha descrito la asociación entre la disminución de los niveles de ADNtc y la respuesta al tratamiento. Por otro lado, unos niveles estables se relacionan con la estabilidad de la enfermedad (Thomsen et al., 2018; Takayama et al., 2018). En nuestra cohorte, trece pacientes progresaron al tratamiento de primera línea (52%), advirtiendo cambios en cuanto a los niveles de ADNlc y ADNtc (reflejado en la fracción mutante) a lo largo de los diferentes tratamientos que reciben, como hemos comentado anteriormente. A continuación, se detallan algunos de los casos analizados durante la evolución de la enfermedad.

- **Mutación no detectada en el momento basal → mutación no detectada durante la evolución tumoral**

En nuestra cohorte hubo 12 pacientes (48%) en los cuales no se detectó ninguna mutación en *RAS* en el momento basal ni durante la evolución tumoral. De ellos, 7 casos recibieron una combinación quimioterapéutica con tratamiento anti-EGFR en primera línea; los cambios en los niveles de ADNlc de dichos pacientes se muestran en la *Figura 15* y algunos de ellos se analizan en mayor detalle.



**Figura 15.** Niveles de ADNlc (ng/μl) cuantificados en cada determinación de los pacientes que recibieron un tratamiento con anti-EGFR en primera línea, debido a que no se detectaron mutaciones en RAS. A la derecha se muestra una ampliación de la parte inferior del gráfico. Pac.: paciente.

En el caso 8, se observa una disminución notable en la concentración de ADNlc, experimentando un estado estable de la enfermedad durante los primeros ciclos del tratamiento. Pero, finalmente, sufrió progresión pulmonar y se administró el tratamiento de segunda línea correspondiente. Dicha progresión podría ser explicada por el pequeño aumento de ADNlc en la tercera determinación (4,96; 0,118 y 0,456 ng/μl), como sugieren otros autores que asocian el incremento en los niveles de ADNlc con un peor pronóstico (Sefrioui et al., 2015; El Messaoudi et al., 2016).

Cabe destacar el paciente 13, el cual es respondedor de la terapia con anti-EGFR en primera línea con una concentración de ADNlc inicial de 0,754 ng/μl. No obstante, unos meses después de finalizar el tratamiento tiene lugar una recaída pulmonar y hepática; realizando entonces el análisis en biopsia líquida para ver si el estado mutacional de RAS había cambiado y valorar el próximo tratamiento. No se detecta ninguna mutación, pero se observa un aumento en los niveles de ADNlc hasta 2,68 ng/μl (Figura 15), indicando la progresión de la enfermedad no asociada a alteraciones en los genes RAS. Habría sido conveniente secuenciar el ADNlc del paciente con el fin de poder encontrar otros posibles mecanismos de resistencia. Por otro lado, el paciente 22 sí experimentó respuesta completa al tratamiento con anti-EGFR a pesar del aumento de los niveles de ADNlc (0,299 vs 0,505 ng/μl). Al contrario, en el caso 16 se detecta una disminución en la concentración de ADNlc (0,538 vs 0,41 ng/μl), asociándose con la respuesta parcial a la terapia. En cuanto al paciente 21, a pesar de que no se observan grandes diferencias en la concentración de ADNlc de una determinación a otra (0,308 vs 0,37 ng/μl), no respondió bien al tratamiento y la enfermedad progresó, por lo que recibió un tratamiento en segunda línea (Folfiri + Bevacizumab), según lo indicado por las guías clínicas (Van Cutsem et al., 2016; Gómez-España et al., 2019).

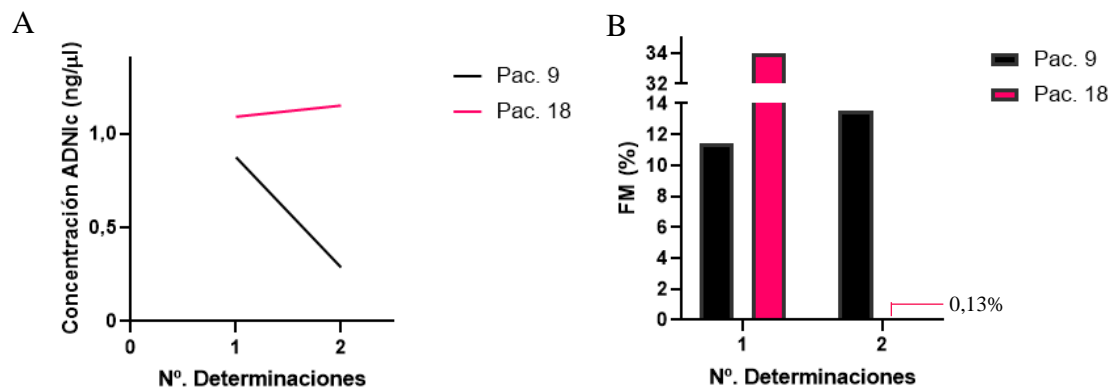
Existen dos casos (1 y 19) que recibieron como primera línea una combinación de 5-FU con antiangiogénico (Bevacizumab), pero ambos progresaron. Algunos autores han señalado la capacidad de los agentes antiangiogénicos, como los anticuerpos anti-VEGF, para inducir la aparición de resistencias. Esto se debe a que dichos agentes destruyen la vasculatura del tumor, creando un déficit de oxígeno y nutrientes. Se ha demostrado que la privación de glucosa en tumores induce mutaciones en KRAS, por lo que esa insuficiencia de oxígeno y glucosa inducida por los anticuerpos anti-VEGF sería la responsable de la aparición de mutaciones de resistencia



(Takayama et al., 2018). Sin embargo, en ninguno de estos casos se detectaron mutaciones en los genes *RAS*, modificando a una nueva línea de tratamiento con una combinación Irinotecán y Cetuximab. El paciente 19 sí que experimentó respuesta completa a esta nueva terapia, pero el paciente 1 desarrolló resistencias, ya que tras 16 ciclos la enfermedad metastásica en hígado y pulmón progresó. Existen evidencias de que interrumpir la terapia anti-EGFR en pacientes que han desarrollado resistencias permite recuperar la sensibilidad del tumor a dicho agente, el cual puede reintroducirse posteriormente en el tratamiento (Goldberg et al., 2018). Este es el caso de nuestro paciente, en el que no se detectaron mutaciones a lo largo de las diferentes determinaciones, pero progresó al tratamiento con Folfiri + Cetuximab en segunda línea. Se produjo entonces un cambio a una terapia con Folfiri + Bevacizumab (tercera línea) y, posteriormente, recibió una cuarta línea en la que se reintrodujo Cetuximab. Tras seis ciclos de tratamiento consiguió enfermedad estable, lo que sugiere la recuperación de la sensibilidad a la terapia con Cetuximab.

- **Mutación detectada en el momento basal → mutación detectada durante la evolución tumoral**

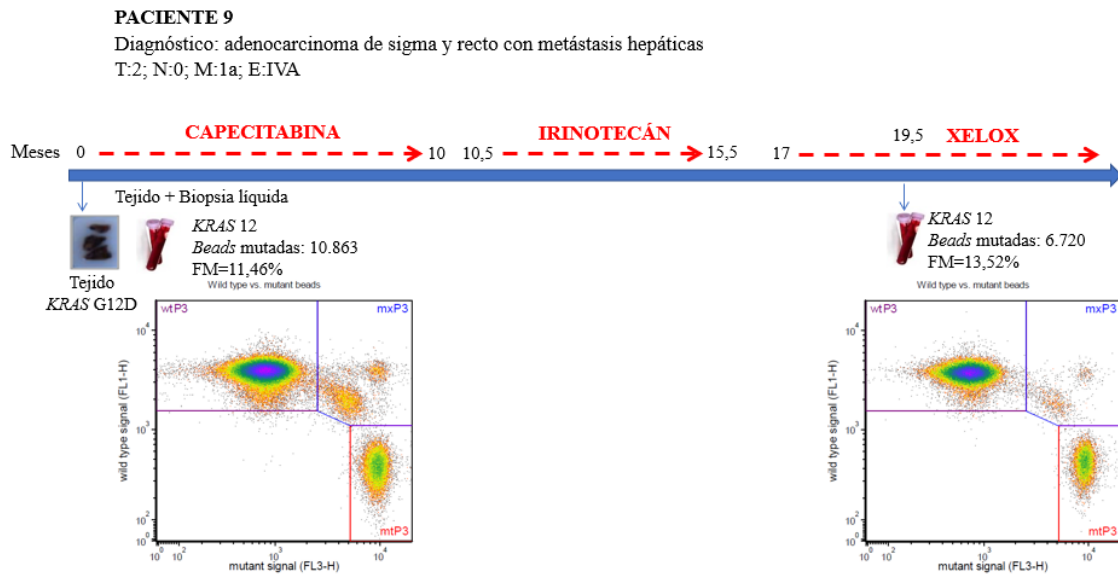
Dentro de la cohorte de pacientes hubo dos casos (9 y 18) en los que se detectó mutación en *KRAS* 12 tanto en la determinación basal como durante la monitorización por la metodología de BEAMing (Figura 16). No obstante, en el primer caso se detecta un aumento en la fracción mutante (11,46% vs 13,52%) mientras que en el paciente 18 se observa una disminución drástica (34,009% vs 0,13%), como se puede observar en la Figura 16B.



**Figura 16.** Evolución de los pacientes 9 y 18, en los cuales se detectó presencia de mutaciones en las dos determinaciones realizadas. A: cambios en los niveles de ADNlc (ng/μl); B: evolución de la fracción mutante, se observa el incremento en la proporción de mutación en el paciente 9 (11,46% vs 13,52%) mientras que una disminución drástica en la fracción mutante en el paciente 18 (34,009% vs 0,13%). Pac.: paciente.

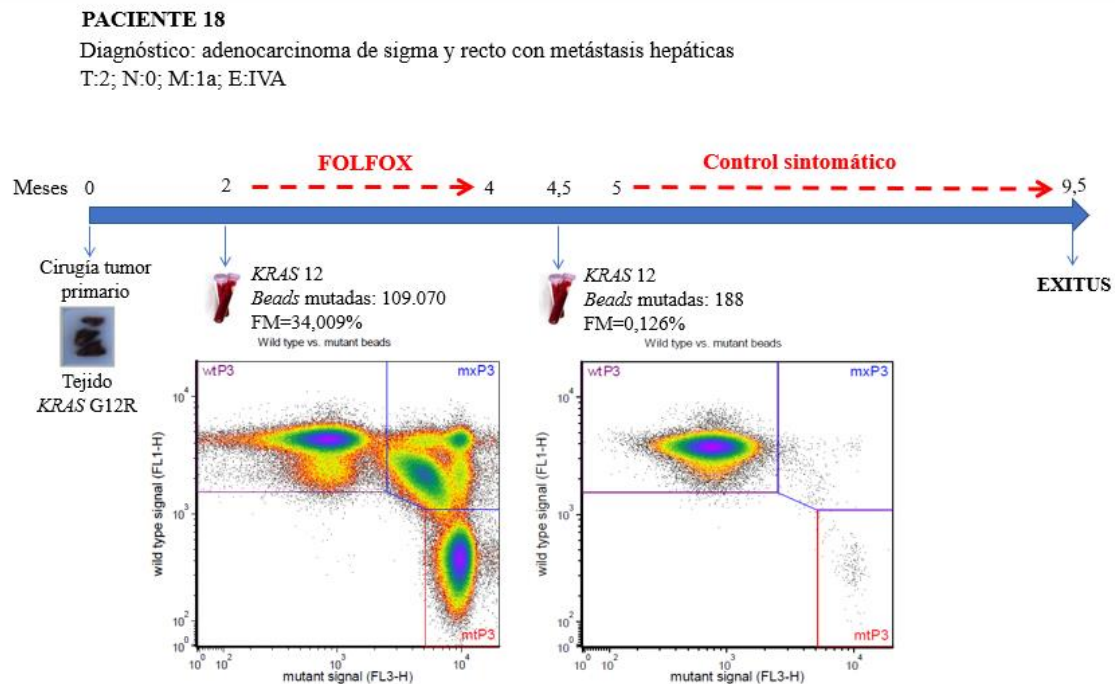
En el paciente 9, al realizar el análisis en sangre se detectó mutación en *KRAS* 12 con una fracción mutante de 11,46%, correspondiente a 10.863 *beads* mutadas, un número muy elevado en comparación al *cutoff* establecido de 40 *beads* mutadas, en correlación con la clínica del paciente el cual presentaba metástasis hepáticas (Vidal et al., 2017; Montagut et al., 2018). Por este motivo, recibió un tratamiento en primera línea sin anti-EGFR (Capecitabina). El tratamiento se suspendió debido a la progresión de la enfermedad, empezando una nueva línea con Irinotecán y alcanzando enfermedad estable tras cuatro ciclos. Después de seis ciclos la enfermedad metastásica progresó y se modificó la línea de tratamiento a Xelox; realizando un segundo análisis en biopsia líquida en el momento de la progresión que reveló una disminución en los niveles de ADNlc (0,874 vs 0,288 ng/μl) pero un aumento en la proporción de mutación ya que la fracción mutante obtenida fue del 13,52%, lo que indica que el paciente no estaba respondiendo a la terapia. Cabe destacar que en esta determinación se detectan 6.720 *beads* mutadas, menos que en

la determinación anterior, aunque la fracción mutante es superior (Figura 17).



**Figura 17. Monitorización del paciente 9.** Ante la detección de mutación en *KRAS* 12 en la determinación basal (FM=11,46% y 10863 beads mutadas) recibió varios ciclos de Capecitabina, a la que no respondió. Tras recibir dos nuevas líneas de tratamiento y, ante la falta de respuesta a ellas, se volvió a analizar RAS en sangre, revelando un aumento en la proporción de mutación (FM=13,52% y 6.720 beads mutadas).

Con respecto al paciente 18, se detectó la presencia de mutación *KRAS* 12 con una fracción mutante muy elevada en la primera determinación, igual a 34,009%, correspondiente a 109.070 beads mutadas. Así pues, recibió una terapia sin anti-EGFR (Folfox). Una vez finalizado el tratamiento se repitió el análisis en sangre, en el que apenas se detectó mutación, pues la fracción mutante fue de 0,126% y 188 beads mutadas, lo que se puede asociar a la estabilidad de la enfermedad. En este caso, apenas hubo variación en la concentración de ADNlc (1,09 vs 1,15 ng/μl), a pesar de la disminución de la fracción mutante (Figura 18).



**Figura 18. Monitorización del paciente 18.** Se advierte una gran disminución de la fracción mutante de una determinación a la siguiente, así como del número de beads; asociándose con la estabilidad de la enfermedad.

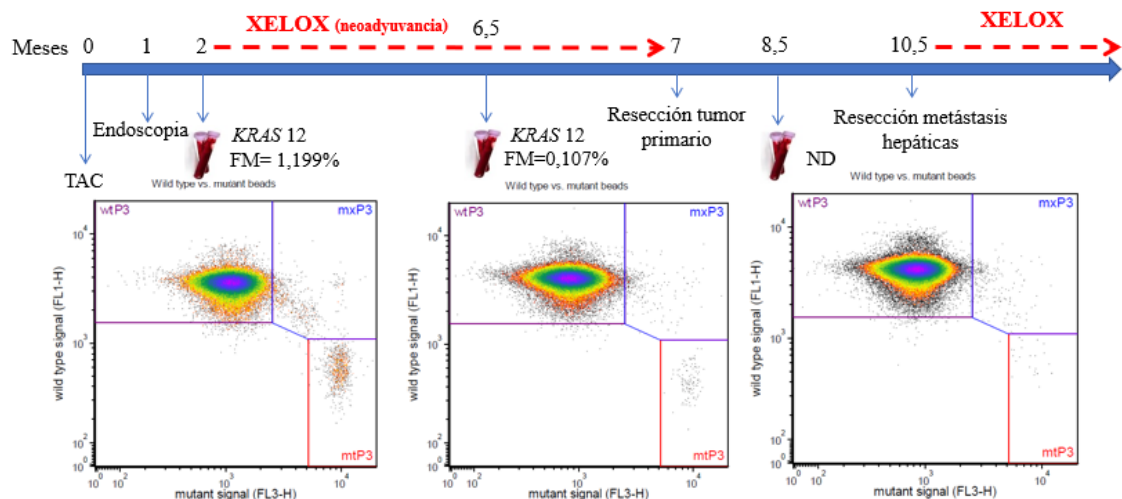
- **Mutación detectada en momento basal → mutación no detectada durante la evolución tumoral**

De los ocho pacientes (32%) mutados en los genes *RAS* en la determinación basal pero en la monitorización de la evolución tumoral se identificó un cambio a no mutado, comentaremos el caso 11. En este paciente, en la primera determinación en sangre se identificó la mutación *KRAS* 12 con una fracción mutante de 1,199% y 832 *beads* mutadas. Ante estos resultados positivos, recibió varios ciclos de Xelox (neoadyuvancia). Unos meses después, durante el curso del tratamiento, se pidió análisis en sangre del estado mutacional de *RAS*, observándose una disminución de la proporción de mutación ya que se detectaron unos niveles muy bajos de la mutación *KRAS* 12 con una fracción mutante de 0,107% y 111 *beads* mutadas, lo que se puede asociar a la respuesta al tratamiento. Posteriormente fue intervenido y se trató de nuevo con Xelox. Un mes después, se realizó un nuevo análisis en sangre y no se detectan mutaciones, lo que indica ausencia de enfermedad mínima residual, puesto que el paciente presentó una buena recuperación libre de enfermedad (*Figura 19*). A pesar del cambio de mutado a no mutado, se aprecia un aumento en la concentración de ADNlc de una determinación a otra (0,322; 0,414 y 1,96 ng/μl).

#### PACIENTE 11

Adenocarcinoma de recto y sigma con metástasis hepáticas

T:4b; N:0; M:1b; E:IVB

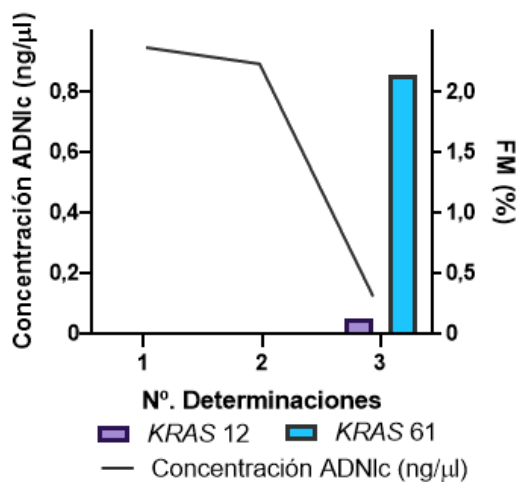


**Figura 19. Monitorización del paciente 11.** Se observa una disminución de la proporción de mutación en la segunda determinación (FM=1,199% y 832 *beads* mutadas vs FM=0,107% y 111 *beads* mutadas). El paciente presentó una buena recuperación, libre de enfermedad, asociado a la no detección de mutaciones en el último análisis de biopsia líquida. ND: no detectable.

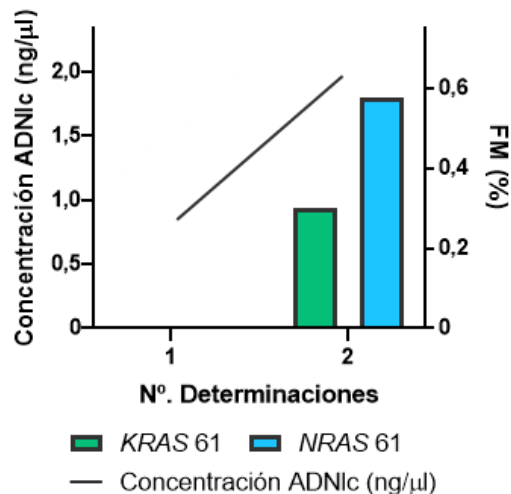
- **Mutación no detectada en el momento basal → mutación detectada durante la evolución tumoral**

En tres pacientes (4, 7 y 12) se determinó un cambio en el estado mutacional de *RAS* de no mutado a mutado a lo largo de la evolución tumoral. En primer lugar, tras la progresión a la primera línea de tratamiento, los pacientes 7 y 12 recibieron un tratamiento anti-EGFR en segunda línea, pero ambos desarrollaron resistencias, las cuales pueden ser explicadas por la detección de nuevas mutaciones en los genes *RAS* (*Figura 20*). Procederemos a analizar en profundidad estos casos.

A. Paciente 7

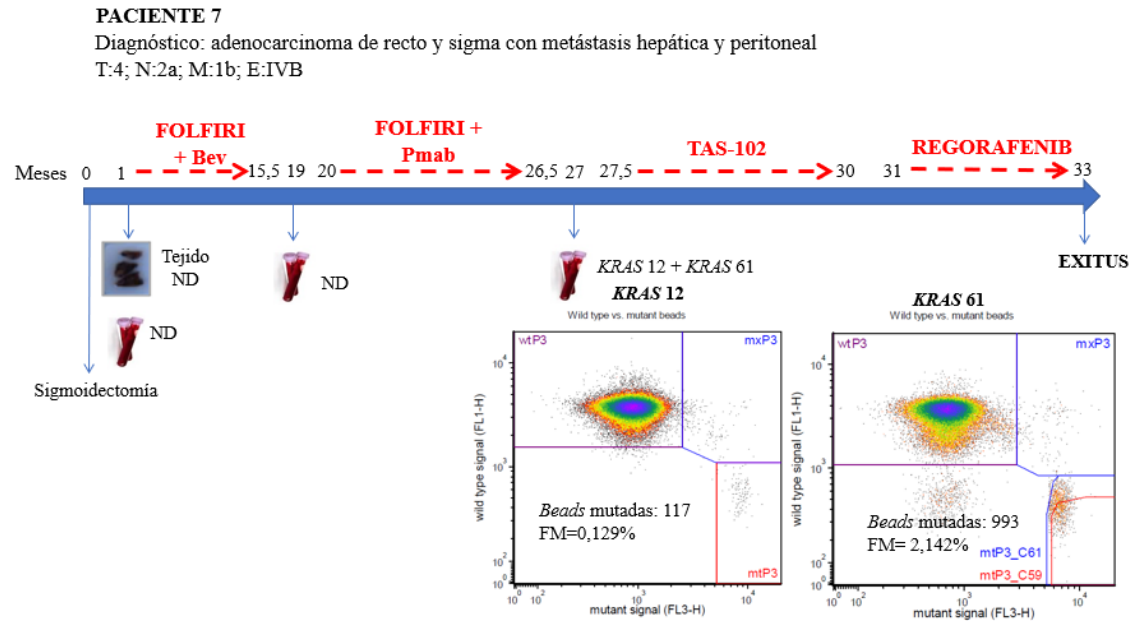


B. Paciente 12



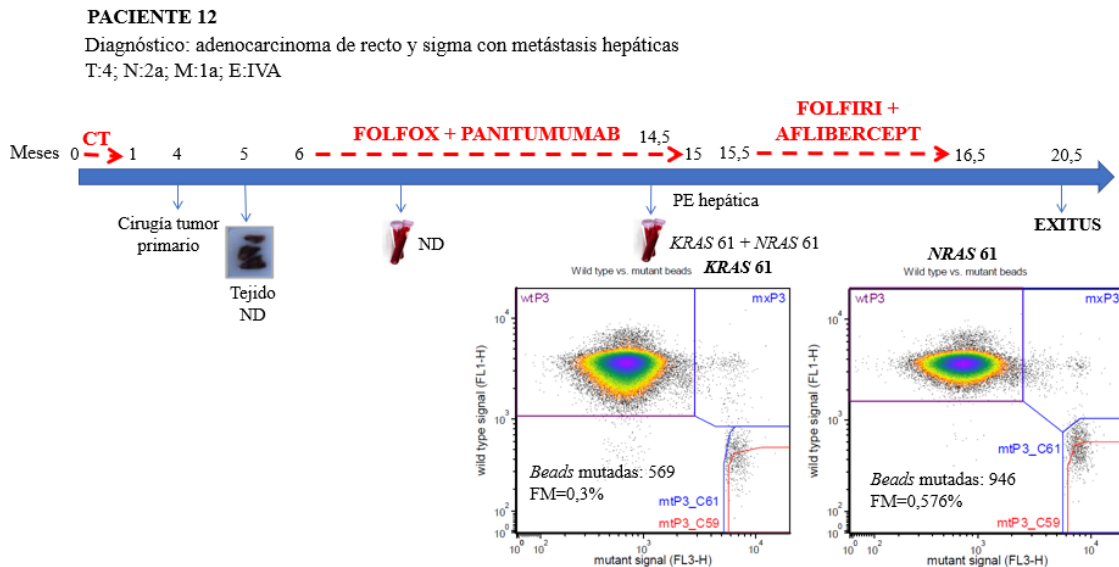
**Figura 20. Monitorización de los cambios en la fracción mutante de los pacientes 7 y 12.** A: evolución del paciente 7 en el que se advierte una disminución en los niveles de ADNlc pero en la tercera determinación se detecta doble mutación en *KRAS* 12 (FM=0,129%) y 61 (FM=2,142%); B: evolución del paciente 12 en el que se advierte un incremento en la concentración del ADNlc y en la segunda determinación se detecta doble mutación en *KRAS* 61 (FM=0,3%) y *NRAS* 61 (FM=0,576%).

En el paciente 7 en el momento inicial antes de empezar tratamiento se determinó el estado mutacional de *RAS*, no detectando en biopsia líquida ni en tejido mutaciones ni en *KRAS* ni en *NRAS*. Posteriormente, ante progresión radiológica de la enfermedad se solicitó de nuevo el análisis de *RAS* en sangre para valorar la siguiente línea de tratamiento siendo de nuevo el resultado negativo; administrando quimioterapia y anti-EGFR (Folfiri + Panitumumab). El paciente consiguió respuesta parcial tras seis ciclos de tratamiento, pero pasados unos meses, la enfermedad metastásica en hígado y pulmón progresó. Repitiendo de nuevo el análisis en biopsia líquida del estado de *RAS*, esta vez se detectó una doble mutación en *KRAS* 12 y *KRAS* 61. La mutación *KRAS* 12 presentaba una fracción mutante de 0,129% y 117 *beads* mutadas y la mutación *KRAS* 61, una fracción mutante de 2,142% y 993 *beads* mutadas (Figura 20A). Aunque se detecta la doble mutación en *KRAS*, se observa una disminución en la concentración de ADNlc desde la primera determinación en sangre hasta la última (4,74; 4,47 y 0,628 ng/μl). En este caso, la disminución de ADNlc no implica respuesta a la terapia ya que la progresión de la enfermedad puede ser explicada por la aparición de nuevas mutaciones en *KRAS* como mecanismo de resistencia (Chen & Lin, 2016; Goldberg et al., 2018). Así pues, se cambió a una línea sin anti-EGFR formada por TAS-102, citotóxico que se suele emplear como tercera línea ya que normalmente proporciona cierto beneficio cuando otros tratamientos han fallado (Gómez-España et al., 2019). No obstante, el paciente no respondió a la terapia y se modificó el tratamiento a Regorafenib, que es un inhibidor de tirosina kinasa que ha demostrado un aumento en la supervivencia en pacientes que no han respondido a otras terapias con otros citotóxicos o anticuerpos, por lo que se suele administrar en las últimas líneas de tratamiento (Van Cutsem et al., 2016). Probablemente, dada la ausencia de mutaciones detectadas en el momento basal y la no respuesta a los diferentes tratamientos disponibles, se modificó a Regorafenib como recomiendan las guías clínicas (Van Cutsem et al., 2016; Gómez-España et al., 2019); pero se debería haber tenido en cuenta las mutaciones detectadas en *RAS* que se localizan *downstream* de EGFR, ya que posiblemente este paciente no iba a responder a la terapia y al cabo de dos meses fue exitus (Figura 21).



**Figura 21. Monitorización paciente 7.** En las dos primeras determinaciones no se detecta mutación en RAS pero, ante la falta de respuesta del tratamiento anti-EGFR en segunda línea, el nuevo análisis en sangre reveló la presencia de doble mutación en KRAS: codón 12 (FM=0,129% y 117 beads mutadas) y codón 61 (FM=2,124% y 993 beads mutadas). Se modificó entonces la línea de tratamiento. Bev: Bevacizumab; ND: no detectable; Pmab: Panitumumab.

En cuanto al paciente 12, en el análisis de la biopsia tisular de tumor primario no se detectaron mutaciones por lo que se le administró un tratamiento compuesto por quimioterapia y anti-EGFR (Folfox + Panitumumab). Tras varios ciclos, se realizó un análisis en biopsia líquida para valorar la respuesta al tratamiento en el que no se detectaron mutaciones en RAS, asociándose a una respuesta parcial a la terapia. Ante una sospecha de progresión hepática se volvió a realizar la determinación en biopsia líquida detectando entonces las mutaciones KRAS 61 con una fracción mutante de 0,3% y NRAS 61 con 0,576%. Asimismo, la concentración de ADNlc aumentó de una determinación a otra (0,848 vs 1,97 ng/μl); en la segunda determinación se observa un incremento notable en el número de beads mutadas para cada mutación (4 vs 569 beads mutadas para KRAS 61 y 6 vs 946 para NRAS 6). Dichos resultados hacen referencia a la progresión de la enfermedad metastásica, lo que coincide con el aumento de las lesiones hepáticas, confirmado por pruebas radiológicas (TAC). Como consecuencia, recibió Folfiri + Aflibercept, una proteína de fusión dirigida a factores angiogénicos, pero finalmente el paciente fue exitus un tiempo después (Figura 22).

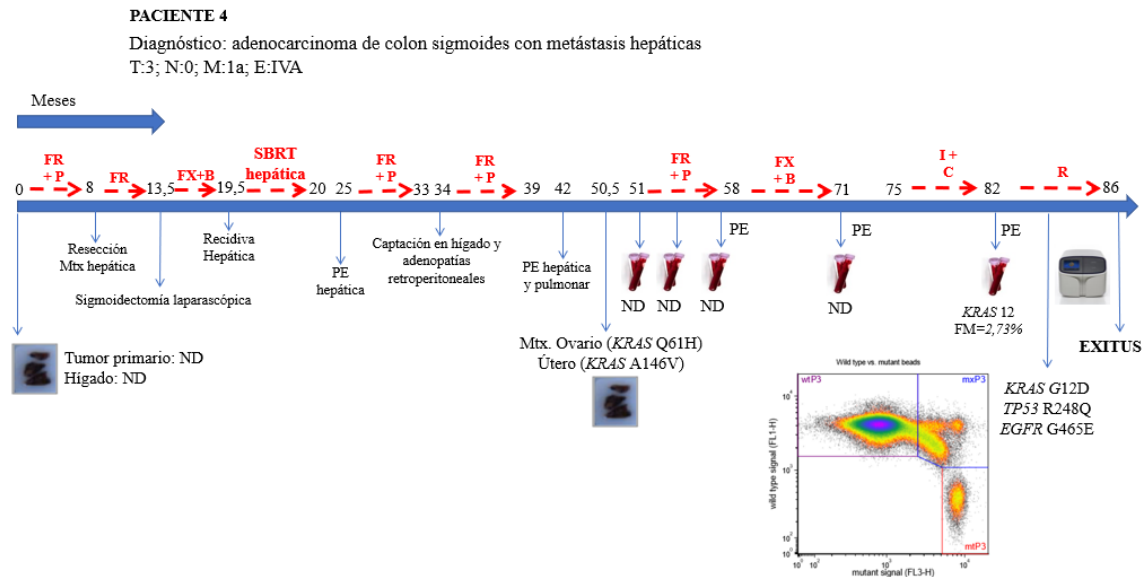


**Figura 22. Monitorización del paciente 12.** En la segunda determinación en sangre, realizada ante la falta de respuesta al tratamiento anti-EGFR, se detectó mutación en *KRAS 61* (FM=0,3% y 569 beads mutadas) y *NRAS 61* (FM=0,576% y 946 beads mutadas), asociado con la progresión de la enfermedad metastásica. CT: Capecitabina; ND: no detectable; PE: progresión de la enfermedad.

Por último, el paciente 4 es un caso de gran relevancia debido a su complejidad y los diferentes tratamientos que recibe. Fue diagnosticada de adenocarcinoma de colon sigmoideas y metástasis hepáticas. Se analizó el estado mutacional de *RAS* en tejido en el tumor primario e hígado pero no se detectaron mutaciones, por lo que se administró quimioterapia y anti-EGFR (Folfini + Panitumumab). Posteriormente fue intervenida por resección de las metástasis, pero unos meses después recayó. No respondió a los sucesivos tratamientos puesto que la enfermedad metastásica se extendió a pulmón, ovario, útero y retroperitoneo. Analizando las mutaciones en biopsia tisular en ovario y útero para estudiar cambios en el estado mutacional de *RAS* asociados a posibles mecanismos de resistencia, se identificaron dos mutaciones: *KRAS* Q61H en ovario y *KRAS* A146V en útero. Estos resultados reflejan la heterogeneidad entre tumor primario y metástasis, ya que la existencia de diferentes clones hace posible que la enfermedad persista y evolucione (Strickler et al., 2018). La heterogeneidad y evolución clonal hace referencia a la aparición de subclones tumorales con diferentes alteraciones moleculares, ya sea espontáneamente o como resultado de la presión ejercida por un tratamiento, que elimina aquellos clones sensibles y favorece el crecimiento de los clones resistentes y más agresivos (Kastrisiou et al., 2018).

Tras la intervención quirúrgica se realizó el análisis en biopsia líquida, por lo que los resultados fueron negativos y no se pudieron detectar estas mutaciones, lo que indica ausencia de enfermedad mínima residual. Se realizaron dos determinaciones para evaluar el estado de *RAS* durante la nueva terapia con Folfini + Panitumumab, siendo negativos para las mutaciones de *KRAS* y *NRAS* y en los que se observó una disminución de la concentración de ADNlc con respecto a la primera determinación (0,456 vs 0,266 y 0,132 ng/μl), pero no respondió; modificando a una combinación de Oxaliplatino y antiangiogénico (Folfox + Bevacizumab). En el momento de la progresión se realizó una nueva determinación en sangre para valorar la reintroducción de anti-EGFR y se observó un aumento en la concentración de ADNlc hasta 0,52 ng/μl pero no se identificaron nuevas mutaciones, por lo que pasó a recibir Irinotecán + Cetuximab. La paciente respondió durante los primeros ciclos, alcanzando enfermedad estable. No obstante, al cabo de unos meses progresó y se volvió a realizar una nueva determinación; en esta ocasión la concentración de ADNlc aumentó notablemente (1,35 ng/μl) y se detectó la mutación *KRAS 12* con una fracción

mutante de 2,73% y 9.770 *beads* mutadas, lo que explica que la paciente no respondiera a la terapia. Por esta razón, se cambió el tratamiento a Regorafenib, sin presentar respuesta (Figura 23).



**Figura 23. Monitorización del paciente 4.** En este caso se observa la heterogeneidad clonal entre tumor primario (no mutación) y metástasis, encontrándose diferencias según la localización de estas (no se detectó ninguna mutación en hígado, pero se identificó la mutación *KRAS* Q61H en ovario y *KRAS* A146V en útero). Durante la monitorización de la evolución tumoral no se detecta ninguna mutación en sangre, excepto en la última determinación (*KRAS* 12 con una FM de 2,73% y 9.770 *beads* mutadas). Se decidió secuenciar el ADNlc con el fin de conocer otros posibles mecanismos de resistencia, detectándose también la mutación en *EGFR* (G465E) y *TP53*. FR: Folfiri; P: Panitumumab; FX: Folfex; B: Bevacizumab; I: Irinotecán; C: Cetuximab; R: Regorafenib; PE: progresión de la enfermedad; Mtx.: metástasis; MND: mutación no detectable.

Debido al gran número de tratamientos recibidos y a la no respuesta al último, se decidió en comité molecular realizar una secuenciación en biopsia líquida para confirmar si había mecanismos de resistencia adicionales. Además de la mutación en *KRAS* 12, detectada previamente por la tecnología BEAMing, se identificó una mutación en *EGFR* (G465E) y en *TP53*, siendo esta última muy frecuente en los casos de cáncer colorrectal, considerado como un factor de mal pronóstico, lo que se puede asociar con el hecho de que unos meses más tarde la paciente fue exitus (Siravegna et al., 2015; Wang et al., 2017). Asimismo, la mutación G465E detectada en *EGFR* en nuestra paciente ha sido descrita como mecanismo de resistencia a la terapia anti-*EGFR*, pues esta ocurre en el dominio extracelular de *EGFR*, impidiendo la unión de los anticuerpos al receptor (Bertotti et al., 2015; Chen & Lin, 2016). También se han descrito otras mutaciones en el dominio extracelular de *EGFR*, como la S492R, que impide la unión del anticuerpo Cetuximab al receptor, sin embargo, no interfiere en la acción de Panitumumab (Montagut et al., 2012). Con estos resultados podemos ver que no solo están implicadas las mutaciones en los genes *RAS*, sino que también se pueden dar otros mecanismos de resistencia como mutaciones en el dominio extracelular de *EGFR*, además de mutaciones en *BRAF* o amplificación en *HER2* y *MET* (Nakamura & Yoshino, 2018; Goldberg et al., 2018). En este sentido, se necesitan de otras metodologías que nos permitan detectar esas posibles mutaciones, como la NGS (*Next Generation Sequencing*).

Así pues, el empleo de varias técnicas para el análisis del ADNlc es crucial durante la monitorización del tratamiento. BEAMing es una metodología válida para llevar a cabo un seguimiento ya que permite observar la proporción mutación durante las diferentes terapias, pero en ocasiones se necesitan de otras técnicas para tener una visión más amplia de lo que está

ocurriendo, como es la NGS, donde no solo se analiza un único o unos pocos genes, sino paneles que nos pueden ayudar a tener una visión global de las posibles alteraciones presentes (*Figura 23*). En resumen, en este caso podemos ver un ejemplo de heterogeneidad entre tumor primario, en el que no se detecta ninguna mutación, y la enfermedad metastásica, en la que existen diferencias en el estado mutacional de *RAS* dependiendo del tipo de metástasis (hígado, ovario y útero); pues la existencia de diferentes subclones es un mecanismo esencial para la continuidad y progresión de la enfermedad. Además, este caso demuestra la capacidad de la biopsia líquida para poder analizar la heterogeneidad y plasticidad tumoral, responsable del desarrollo de resistencias.

En estos tres casos podemos estudiar la aparición de nuevas mutaciones en *RAS* como mecanismo de resistencia a un tratamiento con anti-EGFR. Los tumores sin mutaciones en *RAS* pueden evolucionar a estado mutado debido a la presión selectiva del tratamiento anti-EGFR, de tal forma que disminuye la población tumoral sin alteraciones mientras que los subclones preexistentes con mutaciones en *RAS* comienzan a proliferar (selección clonal), volviéndose detectables en el análisis de ADNlc (Misale et al., 2014; Goldberg et al., 2018). No obstante, otros autores postulan que no todos los clones con mutaciones en *RAS* aparecen por la presión del tratamiento anti-EGFR, sino que podría deberse al efecto de cualquier agente quimioterapéutico (Klein-Scory et al., 2018). Por ello es muy importante llevar a cabo un seguimiento del tratamiento, con el fin de detectar los posibles mecanismos de resistencia.

Un aspecto que debe ser considerado, especialmente en el ámbito clínico, pues su impacto es mayor, es la detección de falsos negativos y positivos. En estos casos, un falso negativo (mutación no detectada en un paciente *RAS* mutado) tanto en plasma como tejido, implica la administración de un tratamiento anti-EGFR que no es el adecuado. No solo la eficacia de la terapia es menor, sino que además puede inducir efectos adversos como toxicidad, reacciones alérgicas, etc. Por otro lado, un falso positivo (detección de mutación en un paciente *RAS* nativo) implica también la administración de una terapia menos eficaz e inadecuada, a la misma vez que puede producir distintos efectos secundarios (García-Foncillas et al., 2017).

La tasa de falsos negativos en biopsia líquida es cuestionable ya que existen ciertas discrepancias entre los resultados de biopsia líquida y tejido. La técnica por excelencia (*gold standard*) es el análisis en tejido y la no detección de mutaciones en biopsia líquida no permite afirmar que no hay mutación. En ese caso se debe recurrir a biopsiar el tejido tumoral, siempre que sea posible. Asimismo, se debe tener en cuenta aquellos casos con una menor liberación de ADNtc, ya que se dificulta su detección, aumentando la tasa de falsos negativos. Estos son casos que presentan metástasis pulmonares únicas, peritoneales o ganglionares, entre otros (Montagut et al., 2018). Al contrario, lesiones metastásicas altamente vascularizadas, como las hepáticas, contribuyen en mayor proporción a la segregación de ADNtc al torrente sanguíneo, por lo que su detección se ve menos limitada (García-Foncillas et al., 2018). Además de estas consideraciones clínicas, la tasa de falsos negativos se puede reducir con la implementación de un protocolo optimizado (en lo que se refiere a los pasos preanalíticos) y con el empleo de tecnologías de análisis de gran sensibilidad (Montagut et al., 2018).

Asimismo, la tasa de falsos positivos también se ve cuestionada. La capacidad de detectar pequeñas tasas de mutación gracias a las tecnologías de elevada sensibilidad representa un arma de doble filo, ya que no siempre los resultados tienen que corresponder al ADN tumoral. Esto es así debido a fenómenos como la hematopoyesis clonal. Este proceso hace referencia a la adquisición de mutaciones somáticas en las células hematopoyéticas, conduciendo a la expansión clonal (Ghatalia et al., 2019). La liberación de ADN mutado por parte de las células sanguíneas a la sangre hace que detectemos mutaciones que no estarían presentes en el tumor, incluso en



pacientes que probablemente no lleguen a padecer la enfermedad, por lo que es un factor que se debe tener en cuenta, por la confusión que puede generar. Por otro lado, es necesario evaluar si detectar pequeños porcentajes de mutación en el ADNtc es una herramienta representativa del tumor y su valor a la hora de decidir sobre un tratamiento u otro, pues podríamos estar privando al paciente de una terapia que en verdad sí que es beneficiosa. No cabe duda de que los avances en biología molecular representan un cambio paradigmático en el tratamiento del cáncer, haciendo posible la medicina personalizada de precisión, pero aún se necesitan más estudios retrospectivos para la validación de la biopsia líquida en clínica y su papel a la hora de administrar un tratamiento.

Otro aspecto que también está sujeto a debate es la frecuencia con la que se deben realizar los análisis en biopsia líquida. No existe un criterio bien establecido, pero algunos autores proponen que lo más práctico es que las determinaciones se hagan cada 4-6 semanas y en conjunto con otras técnicas radiológicas, con el fin de conseguir un seguimiento exitoso (García-Foncillas et al., 2017). En nuestro caso, no se siguió ninguna pauta a la hora de realizar las determinaciones, pues esto dependía de las decisiones del personal médico, así como del estado y/o situación de cada paciente.

Una vez expuesto lo anterior, podemos decir que la tecnología de PCR digital, en concreto BEAMing, es una buena herramienta para realizar el seguimiento del estado mutacional de *RAS* en plasma, permitiendo así tomar decisiones sobre el tratamiento más adecuado para cada paciente en cada momento. Como ventaja frente a otras tecnologías, como NGS, decir que BEAMing proporciona información con mayor velocidad, lo cual es crítico especialmente en pacientes con enfermedad avanzada o en progresión; y su sensibilidad es mayor. Aunque sí que es cierto que las tecnologías NGS proporcionan información sobre otras mutaciones adicionales, su significado clínico a la hora de seleccionar un tratamiento no está claro (García-Foncillas et al., 2017). No obstante, ambas tecnologías se pueden complementar para tener una visión más amplia de las alteraciones moleculares responsables de los mecanismos de resistencia a los diferentes tratamientos y la progresión de la enfermedad, como ocurre en uno de los casos analizados.

En los últimos años está surgiendo la medicina personalizada con el fin de proporcionar al paciente el mejor tratamiento de acuerdo a sus características genéticas y moleculares. Esto está siendo posible gracias a herramientas como la biopsia líquida y a los avances que han sucedido en los últimos años en metodologías más sensibles, que permite, entre otros, analizar el ADNtc, el cual presenta gran potencial como biomarcador diagnóstico, pronóstico y predictivo. En el contexto del CCR, la detección de mutaciones en los genes *RAS* es clave para seleccionar el tratamiento más adecuado para cada paciente y detectar mecanismos de resistencias, así como para la identificación de pacientes con elevado riesgo de recidiva de la enfermedad. Es en este aspecto donde reside el especial interés y la gran aplicabilidad de las biopsias líquidas frente a las biopsias convencionales, una técnica mínimamente invasiva que ofrece información en tiempo real, incluso antes de que se dé una progresión radiológica.

En resumen, los resultados de este trabajo sugieren la gran sensibilidad de las tecnologías basadas en PCR digital para el análisis del estado mutacional de *RAS* en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Además, estas tecnologías se presentan como un enfoque innovador para el diagnóstico molecular en cáncer y monitorización en tiempo real, incluso antes de que se dé la progresión clínica, permitiendo seleccionar el tratamiento que mejor se ajuste a las características de cada paciente en cada momento.

## 5. CONCLUSIONES

En el presente estudio, el objetivo fue evaluar el estado mutacional de los genes *KRAS* y *NRAS* en pacientes de cáncer colorrectal metastásico mediante una tecnología basada en PCR digital en biopsia líquida; así como determinar el estatus mutacional durante la evolución tumoral.

1. Los resultados presentados en este trabajo confirman la sensibilidad del análisis mediante PCR digital en emulsión (BEAMing) para la detección del estado mutacional de los genes *RAS* en el ADNtc en cáncer colorrectal metastásico.
2. Existe una muy buena concordancia (índice Kappa=0,833 y p-value<0,0001) entre los resultados del estado mutacional de *RAS* de biopsia tisular y líquida, lo que evidencia la viabilidad y aplicabilidad del análisis de los genes *RAS* en biopsia líquida.
3. La monitorización de pacientes mediante biopsia líquida permite determinar cambios en la concentración de ADNtc y en el estado mutacional de *RAS* durante la evolución tumoral, estudiando así la plasticidad y heterogeneidad tumoral responsable de la resistencia a la terapia y progresión de la enfermedad.
4. No se encontraron asociaciones significativas entre el estado mutacional de *RAS* y las variables clinicopatológicas en nuestra cohorte. Estos resultados necesitarían ser validados en una cohorte con mayor número de casos.
5. El análisis del ADNtc mediante biopsia líquida constituye una alternativa a la biopsia convencional; caracterizándose por ser una técnica mínimamente invasiva que permite obtener una imagen de la heterogeneidad tumoral, haciendo posible la detección y monitorización de mecanismos de resistencias con el fin de proporcionar al paciente el tratamiento que mejor se ajuste a sus características en cada momento.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ALIX-PANABIÈRES, CATHERINE, & PANTEL, KLAUS. 2016. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov.*, 6(5): 479–491.
- ANDREYEV, H. J., NORMAN, A. R., CUNNINGHAM, D., OATES, J., DIX, B. R., IACOPETTA, B. J., ... UROSEVIC, N. 2001. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the “RASCAL II” study. *Br. J. Cancer*, 85(5): 692–696.
- BENSON, AL B. 3RD, VENOOK, ALAN P., BEKAI-SAAB, TANIOS, CHAN, EMILY, CHEN, YI-JEN, COOPER, HARRY S., ... FREEDMAN-CASS, DEBORAH A. 2014. Colon cancer, version 3.2014. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 12(7): 1028–1059.
- BERTOTTI, ANDREA, PAPP, ENIKO, JONES, SIÂN, ADLEFF, VILMOS, ANAGNOSTOU, VALSAMO, LUPO, BARBARA, ... VELCULESCU, VICTOR E. 2015. The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nature*, 526(7572): 263–267.
- CALABUIG-FARIÑAS, SILVIA, JANTUS-LEWINTRE, ELOÍSA, HERREROS-POMARES, ALEJANDRO, & CAMPS, CARLOS. 2016. Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer—which one will win? *Transl. Lung Cancer Res.*, 5(5): 466–482.
- CAO, LEI, CUI, XINGYE, HU, JIE, LI, ZEDONG, CHOI, JANE RU, YANG, QINGZHEN, ... XU, FENG. 2017. Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosens. Bioelectron.*, 90: 459–474.
- CHEN, GUOLI, & LIN, MING-TSEH. 2016. Impact of genomic heterogeneity associated with acquired anti-EGFR resistance in colorectal cancers. *Transl. Cancer Res.*, 5(Suppl 1): S95–S98.
- CHENG, FEIFEI, SU, LI, & QIAN, CHENG. 2016. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 7(30): 48832–48841.
- COHEN, JACOB. 1960. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ. Psychol. Meas.*, 20(1): 37–46.
- DIAZ, LUIS A., & BARDELLI, ALBERTO. 2014. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.*, 32(6): 579–586.
- DOUILLARD, J. Y., SIENA, S., CASSIDY, J., TABERNERO, J., BURKES, R., BARUGEL, M., ... SIDHU, R. 2014. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.*, 25(7): 1346–1355.
- EL MESSAOUDI, SAFIA, MOULIERE, FLORENT, DU MANOIR, STANISLAS, BASCOUL-MOLLEVI, CAROLINE, GILLET, BRIGITTE, NOUAILLE, MICHELLE, ... THIERRY, ALAIN R. 2016. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin. Cancer Res.*, 22(12): 3067–3077.
- FEARON, ERIC R. 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.*, 6: 479–507.
- FEARON, ERIC R., & VOGELSTEIN, BERT. 1990. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61: 759–767.
- GARCÍA-FONCILLAS, J., ALBA, E., ARANDA, E., DÍAZ-RUBIO, E., LÓPEZ-LÓPEZ, R., TABERNERO, J., & VIVANCOS, A. 2017. Incorporating BEAMing technology as a liquid biopsy into clinical practice for the management of colorectal cancer patients: an expert taskforce review. *Ann. Oncol.*, 28(12): 2943–2949.
- GARCÍA-FONCILLAS, JESÚS, TABERNERO, JOSEP, ÉLEZ, ELENA, ARANDA, ENRIQUE, BENAVIDES, MANUEL, CAMPS, CARLOS, ... VIVANCOS, ANA. 2018. Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 119(12): 1464–1470.
- GHATALIA, POOJA, SMITH, CHAD H., WINER, ARTHUR, GOU, JIANGTAO, KIEDROWSKI, LESLI A., SLIFKER, MICHAEL, ... EL-DEIRY, WAFIK S. 2019. Clinical Utilization Pattern of Liquid Biopsies (LB) to Detect Actionable Driver Mutations, Guide Treatment Decisions and Monitor Disease Burden During Treatment of 33 Metastatic Colorectal Cancer (mCRC) Patients (pts) at a Fox Chase Cancer Center

- GI Onco. *Front. Oncol.*, 8: 652.
- GIL-RAGA, M., JANTUS-LEWINTRE, E., GALLACH, S., GINER-BOSCH, V., FRANGI-CAREGNATO, A., SAFONT-AGUILERA, M. J., ... CAMPS-HERRERO, C. 2018. Molecular subtypes in early colorectal cancer associated with clinical features and patient prognosis. *Clin. Transl. Oncol.*, 20(11): 1422–1429.
- GLOBOCAN, 2018. New Global Cancer Data, Union for International Cancer Control. Visto el 15 de enero de 2019. <<https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>>
- GOLDBERG, R. M.; MONTAGUT, C.; WAINBERG, Z. A.; RONGA, P.; AUDHUY, F.; TAIEB, J.; ... SANTINI, D. 2018. Optimising the use of cetuximab in the continuum of care for patients with metastatic colorectal cancer. *ESMO Open*, 3(4): e000353–e000353.
- GÓMEZ-ESPAÑA, M. A., GALLEGRO, J., GONZÁLEZ-FLORES, E., MAUREL, J., PÁEZ, D., SASTRE, J., ... VERA, R. 2019. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer (2018). *Clin. Transl. Oncol.*, 21(1): 46–54.
- GRASSELLI, J., ELEZ, E., CARATÙ, G., MATITO, J., SANTOS, C., MACARULLA, T., ... VIVANCOS, A. 2017. Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.*, 28(6): 1294–1301.
- GUINNEY, JUSTIN, DIENSTMANN, RODRIGO, WANG, XIN, DE REYNIÈS, AURÉLIEN, SCHLICKER, ANDREAS, SONESON, CHARLOTTE, ... TEJPAR, SABINE. 2015. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.*, 21(11): 1350–1356.
- HANAHAH, DOUGLAS, & WEINBERG, ROBERT. 2000. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Cell*, 100(1): 57–70.
- HANAHAH, DOUGLAS, & WEINBERG, ROBERT A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5): 646–674.
- HUDECOVA, IRENA. 2015. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin. Biochem.*, 48(15): 948–956.
- ISNALDI, EDOARDO, GARUTI, ANNA, CIRMENA, GABRIELLA, SCABINI, STEFANO, RIMINI, EDOARDO, FERRANDO, LORENZO, ... BALLESTRERO, ALBERTO. 2019. Clinico-pathological associations and concomitant mutations of the RAS/RAF pathway in metastatic colorectal cancer. *J. Transl. Med.*, 17(1): 137.
- JO, PETER, KÖNIG, ALEXANDER, SCHIRMER, MARKUS, KITZ, JULIA, CONRADI, LENA CHRISTIN, AZIZIAN, AZADEH, ... GAEDCKE, JOCHEN. 2016. Heterogeneity of KRAS mutation status in rectal cancer. *PLoS One*, 11(4): 1–13.
- JOUNI, RAJA, FERCHICHI, MARWA, BENBRAHIM, EHCEN, AYARI, IMEN, KHANCHEL, FATMA, KOUBAA, WAFI, ... CHADLI-DEBBICHE, ASCHRAF. 2019. KRAS and NRAS pyrosequencing screening in Tunisian colorectal cancer patients in 2015. *Heliyon*, 5(3): e01330–e01330.
- KALYAN, APARNA, KIRCHER, SHEETAL, SHAH, HIRAL, MULCAHY, MARY, & BENSON, AL. 2018. Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.*, 9(1): 160–169.
- KASTRISIOU, MYRTO, ZARKAVELIS, GEORGE, KAMPLETSAS, ELEFTHERIOS, PANOPOULOU, ELENI, GOUSSIA, ANNA, NASIOULAS, GEORGE, ... PENTHEROUDAKIS, GEORGE. 2018. Clonal evolution of colorectal cancer in a patient with serially resected metastases and liquid biopsies: a case report and discussion of the literature. *ESMO Open*, 3(4): e000329.
- KLEIN-SCORY, SUSANNE, MASLOVA, MARINA, POHL, MICHAEL, EILERT-MICUS, CHRISTINA, SCHROERS, ROLAND, SCHMIEGEL, WOLFF, & BARANISKIN, ALEXANDER. 2018. Significance of Liquid Biopsy for Monitoring and Therapy Decision of Colorectal Cancer. *Transl. Oncol.*, 11(2): 213–220.
- KUIPERS, ERNST J., GRADY, WILLIAM M., LIEBERMAN, DAVID, SEUFFERLEIN, THOMAS, SUNG, JOSEPH J., BOELEN, PETRA G., ... WATANABE, TOSHIKI. 2015. Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 1: 15065.
- LAURING, JOSH, & PARK, BEN HO. 2011. BEAMing sheds light on drug resistance. *Clin. Cancer Res.*, 17(24): 7508–7510.
- LECOMTE, THIERRY, BERGER, ANNE, ZINZINDHOUE, FRANCK, MICARD, STÉPHANIE, LANDI, BRUNO,

- BLONS, HÉLÈNE, ... LAURENT-PUIG, PIERRE. 2002. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int. J. Cancer*, 100(5): 542–548.
- LEVI, MICHAEL, PRAYOGI, GINTANG, SASTRANAGARA, FARID, SUDIANTO, EDI, WIDJAJAHAKIM, GRACE, GANI, WINIARTI, ... UTOMO, AHMAD R. 2018. Clinicopathological Associations of K-RAS and N-RAS Mutations in Indonesian Colorectal Cancer Cohort. *J. Gastrointest. Cancer*, 49(2): 124–131.
- MEDINA DIAZ, INGA, NOCON, ANNETTE, MEHNERT, DANIEL H., FREDEBOHM, JOHANNES, DIEHL, FRANK, & HOLTRUP, FRANK. 2016. Performance of Streck cfDNA blood collection tubes for liquid biopsy testing. *PLoS One*, 11(11): 1–18.
- MISALE, SANDRA, DI NICOLANTONIO, FEDERICA, SARTORE-BIANCHI, ANDREA, SIENA, SALVATORE, & BARDELLI, ALBERTO. 2014. Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discov.*, 4(11): 1269–1280.
- MODEST, DOMINIK P., STINTZING, SEBASTIAN, LAUBENDER, RUEDIGER P., NEUMANN, JENS, JUNG, ANDREAS, GIESSEN, CLEMENS, ... HEINEMANN, VOLKER. 2011. Clinical characterization of patients with metastatic colorectal cancer depending on the KRAS status. *Anticancer. Drugs*, 22(9): 913–918.
- MONTAGUT, C., TSUI, D. W., & DIAZ JR, L. A. 2018. Detection of somatic RAS mutations in circulating tumor DNA from metastatic colorectal cancer patients: are we ready for clinical use? *Ann. Oncol.*, 29(5): 1083–1084.
- MONTAGUT, CLARA, DALMASES, ALBA, BELLOSILLO, BEATRIZ, CRESPO, MARTA, PAIRET, SILVIA, IGLESIAS, MAR, ... ALBANELL, JOAN. 2012. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat. Med.*, 18: 221.
- NAKAMURA, YOSHIKI, & YOSHINO, TAKAYUKI. 2018. Clinical Utility of Analyzing Circulating Tumor DNA in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*, 23(11): 1310–1318.
- NORMANNO, N., ESPOSITO ABATE, R., LAMBIASE, M., FORGIONE, L., CARDONE, C., IANNACCONE, A., ... CIARDIELLO, F. 2018. RAS testing of liquid biopsy correlates with the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus cetuximab in the CAPRI-GOIM trial. *Ann. Oncol.*, 29(1): 112–118.
- NORMANNO, NICOLA, TEJPAR, SABINE, MORGILLO, FLORIANA, DE LUCA, ANTONELLA, VAN CUTSEM, ERIC, & CIARDIELLO, FORTUNATO. 2009. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 6(9): 519–527.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2019. Cáncer. Visto el 15 de enero de 2019. <<https://www.who.int/topics/cancer/es/>>
- REINERT, THOMAS, SCHØLER, LONE V., THOMSEN, RUNE, TOBIASEN, HEIDI, VANG, SØREN, NORDENTOFT, IVER, ... ANDERSEN, CLAUS L. 2016. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*, 65(4): 625–634.
- SEFRIQUI, DAVID, SARAFAN-VASSEUR, NASRIN, BEAUSSIRE, LUDIVINE, BARETTI, MARINA, GANGLOFF, ALICE, BLANCHARD, FRANCE, ... DI FIORE, FRÉDÉRIC. 2015. Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. *Dig. Liver Dis.*, 47(10): 884–890.
- SIRAVEGNA, GIULIA, MUSSOLIN, BENEDETTA, BUSCARINO, MICHELA, CORTI, GIORGIO, CASSINGENA, ANDREA, CRISAFULLI, GIOVANNI, ... BARDELLI, ALBERTO. 2015. Erratum: Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat. Med.*, 21: 827.
- STRICKLER, JOHN H., LOREE, JONATHAN M., AHRONIAN, LEANNE G., PARIKH, APARNA R., NIEDZWIECKI, DONNA, PEREIRA, ALLAN ANDRESSON LIMA, ... KOPETZ, SCOTT. 2018. Genomic landscape of cell-free DNA in patients with colorectal cancer. *Cancer Discov.*, 8(2): 164–173.
- TAKAYAMA, YUJI, SUZUKI, KOICHI, MUTO, YUTA, ICHIDA, KOSUKE, FUKUI, TARO, KAKIZAWA, NAO, ... RIKIYAMA, TOSHIKI. 2018. Monitoring circulating tumor DNA revealed dynamic changes in KRAS status in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(36): 24398–24413.
- THIEL, ALEXANDRA, HEINONEN, MIRA, KANTONEN, JONAS, GYLLING, ANNETTE, LAHTINEN, LAURA,

- KORHONEN, MARI, ... RISTIMAKI, ARI. 2013. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch.*, 463(5): 613–621.
- THOMSEN, C. B., HANSEN, T. F., ANDERSEN, R. F., LINDEBJERG, J., JENSEN, L. H., & JAKOBSEN, A. 2018. Monitoring the effect of first line treatment in RAS/RAF mutated metastatic colorectal cancer by serial analysis of tumor specific DNA in plasma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 37(1): 55.
- VAN CUTSEM, E., CERVANTES, A., ADAM, R., SOBRERO, A., VAN KRIEKEN, J. H., ADERKA, D., ... ARNOLD, D. 2016. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.*, 27(8): 1386–1422.
- VAN CUTSEM, ERIC, LENZ, HEINZ-JOSEF, KOHNE, CLAUS-HENNING, HEINEMANN, VOLKER, TEJPAR, SABINE, MELEZINEK, IVAN, ... CIARDIELLO, FORTUNATO. 2015. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 33(7): 692–700.
- VAUGHN, CECILY P., ZOBELL, SCOTT D., FURTADO, LARISSA V, BAKER, CHRISTINE L., & SAMOWITZ, WADE S. 2011. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes, Chromosom. Cancer*, 50(5): 307–312.
- VERA, R., APARICIO, J., CARBALLO, F., ESTEVA, M., GONZALEZ-FLORES, E., SANTIANES, J., ... FERNANDEZ-CEBRIAN, J. M. 2019. Recommendations for follow-up of colorectal cancer survivors. *Clin. Transl. Oncol.*
- VIDAL, J., MUINELO, L., DALMASES, A., JONES, F., EDELSTEIN, D., IGLESIAS, M., ... MONTAGUT, C. 2017. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann. Oncol.*, 28(6): 1325–1332.
- VINCENZI, BRUNO, CREMOLINI, CHIARA, SARTORE-BIANCHI, ANDREA, RUSSO, ANTONIO, MANNAVOLA, FRANCESCO, PERRONE, GIUSEPPE, ... APRILE, GIUSEPPE. 2015. Prognostic significance of K-Ras mutation rate in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget*, 6(31): 31604–31612.
- VOGELSTEIN, B., & KINZLER, K. W. 1999. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(16): 9236–9241.
- VYMETALKOVA, VERONIKA, CERVENA, KLARA, BARTU, LINDA, & VODICKA, PAVEL. 2018. Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(11): 3356.
- WANG, PENG, LIANG, JIANWEI, WANG, ZHENG, HOU, HUIRONG, SHI, LEI, & ZHOU, ZHIXIANG. 2017. The prognostic value of p53 positive in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Tumour Biol.*, 39(5): 1010428317703651.
- YAMADA, TAKESHI, MATSUDA, AKIHISA, KOIZUMI, MICHIIRO, SHINJI, SEIICHI, TAKAHASHI, GORO, IWAI, TAKUMA, ... YOSHIDA, HIROSHI. 2018. Liquid biopsy for the management of patients with colorectal cancer. *Digestion*, 99(1): 39–45.
- YIU, ANDREW J., & YIU, CHU Y. 2016. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.*, 36: 1093–1338.

# ANEXO

## I. Consentimiento de información al paciente



### DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONANTE: \_\_\_\_\_

**ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS.**

<b>LÍNEA DE INVESTIGACIÓN</b>	Oncología Molecular
<b>INVESTIGADOR PRINCIPAL</b>	Dr. Carlos Camps
<b>CENTRO</b>	Servicio de Oncología Médica (SOM) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV)
<b>EQUIPO INVESTIGADOR</b>	Facultativos del SOM, personal de la Unidad de Investigación Clínica del SOM, y del laboratorio de Oncología Molecular, miembros de los servicios quirúrgicos involucrados (Cirugía Torácica, Cirugía General), facultativos del servicio de Anatomía Patológica.

**1. DESCRIPCIÓN GENERAL:** La línea de investigación de “Oncología Molecular” centra sus esfuerzos en la comprensión de la patogénesis de los eventos genéticos y moleculares implicados en el origen y la progresión del cáncer. Uno de los aspectos de mayor interés en esta línea de investigación es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser usados en la clínica y ayuden a la individualización del tratamiento del cáncer.

**PROPÓSITO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:** Analizar en diferentes tipos de muestras, factores que puedan ser importantes en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta del cáncer a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos tóxicos asociados a dichos tratamientos. Si bien la constitución genética de los seres humanos es muy similar, existen pequeñas diferencias entre las personas que, en algunos casos podrían asociarse con el desarrollo o evolución de diferentes enfermedades. Por otra parte, los tumores también presentan diferencias a nivel genético que necesitan seguir siendo estudiadas. Por lo tanto, para poder llevar a cabo esta línea de investigación, es necesario disponer de muestras biológicas para poder realizar estos estudios genéticos. También es necesario recoger datos sobre su historial médico para obtener información que pudiera tener relevancia para nuestros estudios.

**2. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:** Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido en las instalaciones del CHGUV se tomarán muestras de sus tejidos y/o sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente una parte de la muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a una colección de muestras que se usará con fines de investigación biomédica, sin que esto suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. También es posible que le recojamos muestras biológicas que no requieran un procedimiento invasivo, como orina heces, saliva etc. o que el procedimiento de obtención sea mínimamente invasivo como una extracción de sangre. Las muestras que done se almacenarán en una colección de muestras que corresponden a una Línea de Investigación sobre Oncología Molecular, que se encuentra en las instalaciones de la FIHGUV y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras solo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y que hayan sido evaluados y aprobados por el CEIC, en los que participen miembros del equipo investigador que forma parte de esta línea de investigación.

**3. OBJETIVO:** El Centro Sanitario en el que usted está siendo atendido/tratado, dispone de investigadores que desean recoger y almacenar sus muestras biológicas para poder realizar proyectos de investigación biomédica en el área de la Oncología. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamientos.

**4. BENEFICIOS ESPERADOS:** Por su participación no percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Sin embargo, si las intervenciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares. Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales. La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

**5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN:** Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información con la que contamos relacionada con su enfermedad.

Es posible, que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de los datos obtenidos en la investigación. A estos efectos se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que y se adjunta al presente documento.

**6. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.** La decisión de donar muestras biológicas es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se han llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

**7. RIESGOS.** El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestras sobrantes de la intervención, muestras invasivas obtenidas durante los procedimientos de diagnóstico, o muestras de sangre extra que se han obtenido para ser utilizadas en investigación. En este último caso, la extracción de sangre, apenas tiene efectos secundarios, lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. En el caso de las muestras que requieren procedimientos más complejos o invasivos, estos sólo se realizarán si forman parte del procedimiento habitual que debe realizarse para su correcto diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

**8. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD.** Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el Investigador del Proyecto, que debe estar inscrita en un registro nacional dependiente del Instituto de Salud Carlos III y que debe cumplir con todos los requisitos legales. Sólo el INVESTIGADOR RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento y de garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación. La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias de los proyectos derivados de la Línea de Investigación, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

La cesión de muestras así como de la información contenida en las bases de datos vinculadas a las mismas, solo se realizará si forman parte de la línea de investigación en la cual participan miembros del equipo investigador, realizándose un procedimiento de codificación previo, que consiste en desligar la información que le identifica sustituyéndola por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, y ejercer los derechos de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 11) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al titular del centro el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de un documento acreditativo de su identidad.



**9. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS FINALIZACION DE LA LÍNEA DE INVESTIGACION.** En el supuesto de finalización de la línea de investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones: a) la destrucción de la muestra sobrante, b) su utilización en otros proyectos de investigación biomédica, para lo cual, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al Biobanco del CHGUV (en el siguiente apartado le explicamos de manera resumida en que consiste un biobanco y cuáles son sus objetivos). En este caso, deberá marcar esta opción en el consentimiento incluido en este documento. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

**10. BIOBANCO. DEFINICIÓN Y OBJETIVOS.** El Biobanco del CHGUV es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge una colección organizada de muestras biológicas. Estas muestras almacenadas en el biobanco, tienen por finalidad ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que hayan sido aprobados por los comités ético y científico a los que esté adscrito el biobanco. Los resultados de las investigaciones realizadas con estas muestras pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades o en nuevas formas de tratamientos de las mismas. Sus muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

## 11. DECLARACIONES Y FIRMAS.

### Declaración del donante:

D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

### DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes del procedimiento
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán tratados de acuerdo a la legislación vigente.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo
- Que en cualquier momento, yo, mi representante legal, o tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, puedo solicitar información sobre los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

### CONSIENTO

- Que el CHGUV y la FIHGUV, a través de los miembros del equipo investigador de la Línea de Investigación: "Oncología Molecular", utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas dentro del marco de la línea de investigación antes mencionada, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.
- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de: (márquese con una cruz lo que proceda)
  - Mis tejidos excedentes
  - Muestra de heces, orina o saliva
  - Muestra de sangre
  - Muestras obtenidas en procedimientos que sean necesario para el diagnóstico)
- Yo, mi representante legal o tutor, accedo (márquese sí o no) a que los miembros del equipo investigador puedan contactarme en el futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.
  - Sí
  - No
- Que en el supuesto de finalización de la línea de investigación, mis muestras sean (márquese con una cruz lo que proceda)
  - destruidas
  - cedidas al Biobanco del CHGUV y anonimizadas
  - cedidas al Biobanco del CHGUV codificada, junto a los datos clínicos asociados.

D. Dña : \_\_\_\_\_ FIRMA: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

### DECLARACIÓN DEL PROFESIONAL DE SALUD:

He informado debidamente al donante:

Nombre facultativo: \_\_\_\_\_ DNI \_\_\_\_\_ Colegiado Nº \_\_\_\_\_

FIRMA : \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_



**12. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.**

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ revoco el consentimiento prestado en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ como representante legal de D./ Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ revoco el consentimiento prestado en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_



**SOLICITUD DE INFORMACION DE DATOS O RESULTADOS DERIVADOS DE LAS INVESTIGACIONES**

<b>LÍNEA DE INVESTIGACIÓN</b>	Oncología Molecular
-------------------------------	---------------------

**PACIENTE:** \_\_\_\_\_

D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____  D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____
--

**SOLICITO**

Ser informado/a del resultado de las investigaciones realizadas con la/las muestra/s donada/s de manera voluntaria en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

**II. Mutaciones de *KRAS* y *NRAS* detectadas por el test OncoBEAM™ RAS CRC CE-IVD de Sysmex ®**

Codón	Sustitución	Cambio aminoácido	COSMIC ID
<i>KRAS</i>			
KR2Cdn12	34G>A	G12S	COSM517
	34G>C	G12R	COSM518
	34G>T	G12C	COSM516
	35G>A	G12D	COSM521
	35G>C	G12A	COSM522
	35G>T	G12V	COSM520
KR2Cdn13	38G>A	G13D	COSM532
KR3Cdn59	175G>A	A59T	COSM546
KR3Cdn61	182A>T	Q61L	COSM553
	182A>G	Q61R	COSM552
	183A>C	Q61H	COSM554
	183A>T	Q61H	COSM555
KR4Cdn117	351A>C	K117N	COSM19940
	351A>T	K117N	COSM28519
KR4Cdn146	436G>A	A146T	COSM19404
	437C>T	A146V	COSM19900
<i>NRAS</i>			
NR2Cdn12	34G>A	G12S	COSM563
	34G>C	G12R	COSM561
	34G>T	G12C	COSM562
	35G>A	G12D	COSM564
	35G>C	G12A	COSM565
	35G>T	G12V	COSM566
NR2Cdn13	37G>C	G13R	COSM569
	38G>A	G13D	COSM573
	38G>T	G13V	COSM574
NR3Cdn59	175G>A	A59T	COSM578
NR3Cdn61	181C>A	Q61K	COSM580
	182A>G	Q61R	COSM584
	182A>T	Q61L	COSM583
	183A>C	Q61H	COSM586
	183A>T	Q61H	COSM585
NR4Cdn117	351G>C	K117N	
	351G>T	K117N	
NR4Cdn146	436G>A	A146T	COSM27174

### III. Parámetros de análisis (APs) y *cutoffs* de la metodología BEAMing

#### A. Parámetros de análisis (APs)

Parámetro	Abreviatura	Definición
AP 1	SB#	Nº de <i>beads</i>
AP 2	SBpos	Posición de las <i>beads</i>
AP 3	IP1%	Porcentaje Gate 1 Plot 1
AP 4	EB#	Nº de <i>beads</i> extendidas
AP 5	EB%	Ratio de <i>beads</i> extendidas
AP 6	IP2%	Porcentaje Gate 1 Plot 2
AP 7	IIP2%	Porcentaje Gate 2 Plot 2
AP 8	IIP2%	Porcentaje Gate 3 Plot 2
AP 9	EB%/IP2%	Ratio <i>beads</i> extendidas/Porcentaje Gate 1 Plot 2
AP 10	wtP3pos	Posición Plot 3 <i>Wildtype</i>
AP 11	wtP3CV	Covarianza Plot 3 <i>Wildtype</i>
AP 12	mtP3pos	Posición Plot 3 Mutante
AP 13	mtP3CV	Covarianza Plot 3 Mutante
AP 14	mtP3#	Número Plot 3 mutante
AP 15	Mut. Fraction	Fracción mutante

#### B. *Cutoffs* establecidos para cada codón

Codón	<i>Cutoff beads</i> mutadas	<i>Cutoff FM (%)</i>
KR2Cdn12	40	0,029
KR2Cdn13	48	0,035
KR3Cdn59	36	0,056
KR3Cdn61	32	0,048
KR4Cdn117	36	0,069
KR4Cdn146	54	0,087
NR2Cdn12	34	0,077
NR2Cdn13	30	0,068
NR3Cdn59	30	0,069
NR3Cdn61	20	0,052
NR4Cdn117	22	0,055
NR4Cdn146	24	0,048