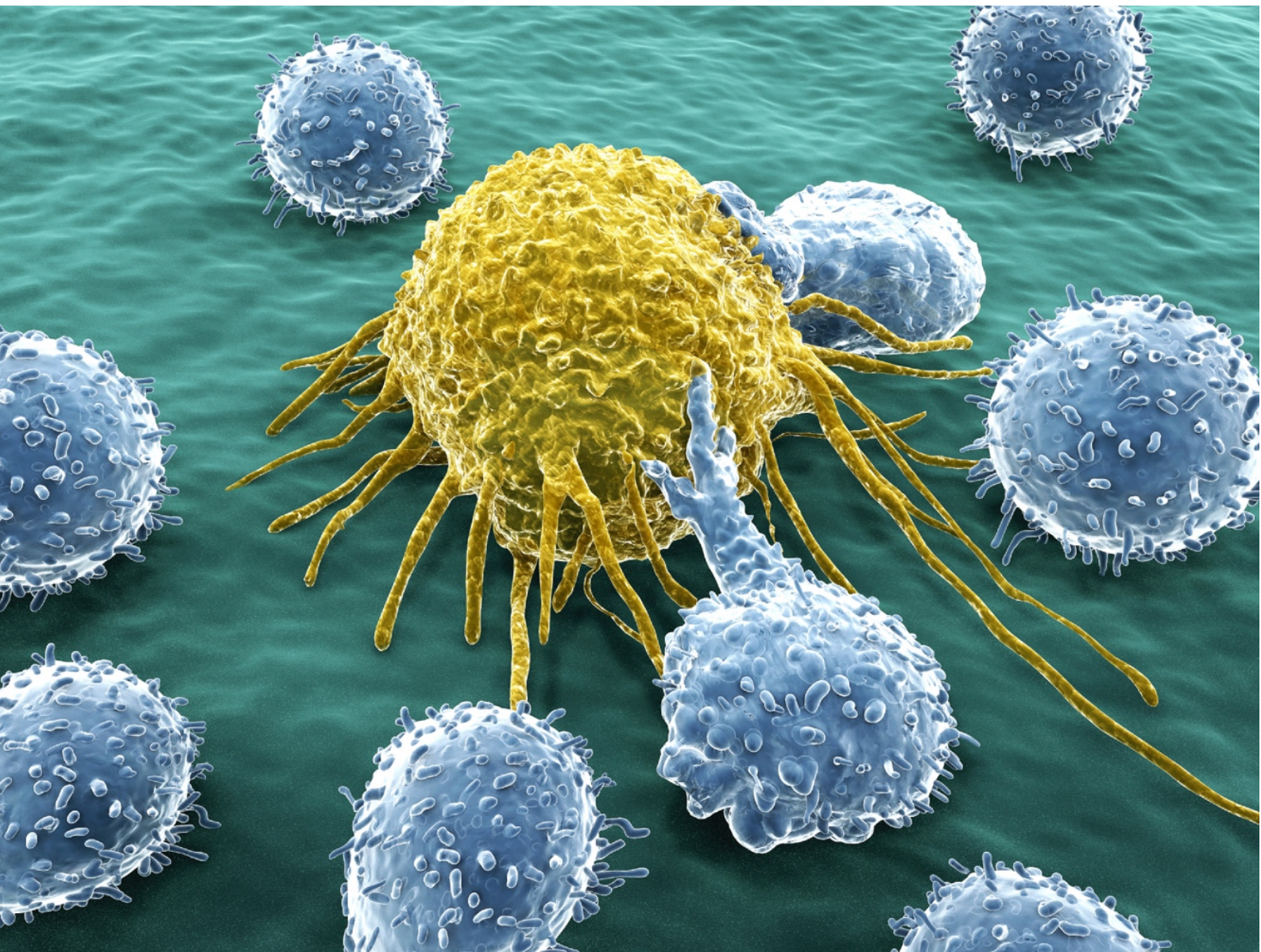


*El papel de los receptores KIR y FcγRIIIa en la
respuesta ADCC mediada por IgG1*



Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

El papel de los receptores KIR y FcγRIIIa en la respuesta ADCC mediada por IgG1

Áurea J. Borrero Palacios

Licenciada en Biología; Licenciada en Bioquímica; Máster en Biología Molecular y Celular.

Prof. Jesús García-Foncillas López, MD; PhD.

Instituto de Investigación Sanitaria - Fundación Jiménez Díaz

Traslational Oncology Division

Oncohealth Institute

Avda. de los Reyes Católicos nº2

28040 Madrid

“Dondequiera que se ama el arte de la Medicina se ama también a la humanidad”

Platón.

Esta Tesis está dedicada a mis padres, y a:

A Mari

A Fina

A Taro

A Diego

A Fernando

A Remi...

...Porque habéis luchado de manera heroica frente a esta dura enfermedad.



Jesús García-Foncillas López, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Zaragoza, Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Subdirector del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la UAM, Director del *OncoHealth Institute* (Quironsalud), Director del Departamento de Oncología del Hospital Fundación Jiménez Díaz y Director del *Translational Oncology Division* del Instituto de Investigación Sanitaria - Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD).

CERTIFICO: que el trabajo titulado: “El papel de los receptores KIR y FcγRIIIa en la respuesta ADCC mediada por IgG1” ha sido realizado bajo mi dirección en el *Translational Oncology Division* del IIS-FJD, por Áurea J. Borrero Palacios, Licenciada en Biología y Bioquímica, para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Considero que este trabajo reúne los requisitos necesarios para que el interesado pueda optar al citado título.

Madrid, 4 de Octubre de 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer al **Dr. Jesús García-Foncillas López** por abrirme las puertas de su laboratorio, darme la oportunidad de formar parte de su equipo y de realizar esta Tesis Doctoral. Te agradezco, Jesús, tu trato cordial y cariñoso que siempre has tenido conmigo, tu apoyo constante para seguir creciendo, y tu ayuda en tantos momentos que hemos vivido en estos años de trabajo. Y por todos los privilegios que he tenido por el hecho de formar parte de tu equipo. También te doy las gracias por los buenos momentos vividos, incluso en las reuniones de laboratorio y en las comidas de empresa. Sin tu apoyo, finalizar esta Tesis no habría sido posible! Gracias!

También agradecer, como no, a las personas más importantes de mi vida: **Mis padres y mi hermano Juan**. Siempre me habéis dado todo y quizás, terminar esto, sirva en pequeña medida para agradecer todos los esfuerzos constantes que habéis hecho en estos 31 años. Para vosotros, mi educación y formación siempre ha sido lo primero y hoy quiero dedicaros esta Tesis a vosotros. Sabéis lo duro que ha sido el camino pero solamente ver que esto ha salido adelante y que estáis felices por ello, merece la pena. Gracias por todo lo que me habéis dado, por no rendiros en esta tarea y por animarme a no tirar la toalla. Tampoco habría sido posible mi estancia en Madrid sin los *tuppers* de mamá y sin tus llamadas interminables. Tampoco habría sido posible sin el apoyo de mi padre y tu “herencia” de la pasión por la Medicina. Gracias, **esta Tesis va por vosotros!**

A ti, amigo, compañero de locuras, el mejor compañero de trabajo que alguien puede tener.

Todas las etapas de la vida tienen cosas buenas y malas. Y ¡no han sido pocas las malas!, me diste fuerzas y ánimos en mis peores momentos, aguantaste cada queja y cada lamento con todo tu cariño, defensor de injusticias en las que todos callan, cómplice absoluto en nuestras estrategias...

Compañero de compras interminables en las que la que termino sentada en un banco esperándote a ti soy yo, compañero de cine en La Ciudad de la Imagen, de postureo máximo en la calle Serrano, tardes de *Abercrombie & Fitz* y de *Las rozas Village*. Un auténtico cuatro que, de vez en cuando, roza el cinco. Conversaciones interminables, paseos divertidos por las calles de Madrid, disparidad de opiniones, respeto, cariño. Diversión escatológica en la que nuestro máximo afán era “*Joder a Raimundo y a medio Mundo*”, sobre todo en las comidas. Asesor en el amor, calma para mis nervios y consejos sabios. MasterChef insuperable. Las mejores tardes en cultivos y en anatomía con los chicos, las mejores cremas de laboratorio realizadas en la “Fundición”. El que dejó claro, desde el primer momento, que me habían contratado por ser rubia y guapa y no por la inteligencia (lo que no esperabas que esa rubia angelical, además de inteligente iba a ser tu cómplice en tantas y tantas horas, y por qué no decirlo, un tanto princesa... ..de

Shreck. Buscavidas en el hospital para conseguir los objetivos. Educado, caballero, gusto exquisito (quizá un poco anticuario pero con un toque de *Bikkembergs* se arregla todo). No podía haber sido otro el que me aguantase todo este tiempo.

Ese eres tú, siempre con la cabeza alta pasando muy por encima de tantas dificultades. ¡Que nadie te haga creer que vales menos! Simplemente, es la manera que tienen de apagar tu luz. Porque brillas con luz propia y porque lo saben: ¡Eres la joya de ese laboratorio, la joya de tu familia y de tu super chica! Y eres mi joya, más que un amigo, eres mi alma gemela, la joya que me acompañó en mi etapa que hoy se cierra. Que la envidia de tantos no te apague, sigue adelante porque brillas por ti mismo.

No hay palabras de agradecimiento que se puedan escribir y que correspondan a la realidad que llevo dentro. Tu corazón no cabe en ese cuerpo de “Dos-Metrosexual” que Dios te ha dado. Una llamada de SOS bastó para sacar lo que ya todos veíamos como imposible: la motivación para acabar esto. Para tener el 100% de ti, todo tu apoyo y ayuda en un trabajo que estaba perdido. Sin duda, lo mejor de esta etapa has sido tu. Quiero darte las gracias, por todos los momentos vividos en los cuatro años que duró mi etapa en Madrid y por todos lo que han seguido. **Javichu...** GRACIAS, sin ti, nada de esto habría sido posible. Esta Tesis es tan tuya como mía.

También quiero agradecer de manera muy especial al **Dr. Federico Rojo Todo**, y a su departamento, por toda la colaboración en este proyecto y por vuestro trato familiar y amable. Me habéis hecho sentirme una más en Anatomía. Por todo ello, Fredy, gracias de verdad!; siempre me he sentido bienvenida y muy valorada en tu departamento y agradezco infinitamente toda tu ayuda en este proyecto.

Quiero agradecer muy especialmente a **todas las personas que han participado en este ensayo clínico...** ya no estáis aquí... pero vuestra generosidad inmensa, al participar en esto, va a hacer que miles de personas se beneficien de una nueva posibilidad de tratamiento. Sois todo un ejemplo a seguir, y no solo yo os doy las gracias... estoy segura de que cualquier enfermo de cáncer os está eternamente agradecido.

Hay personas que pasan por la vida poco tiempo pero que llegan para quedarse. Esa eres tu, **Clariña!!!** Y así llegó: galleguiña y muy tímida, pero con una capacidad de aprendizaje asombrosa. Me acompañaste en mis 4 primeros meses de vida laboral. Que si ya de por sí son momentos duros, podemos decir que los míos tenían un *plus extra*. Pero ahí estabas tu, angelito de la guarda, para aplacar los malos rollos y echarme una mano en todo. De ti aprendí muchísimo, sobre todo con tus super esquemas de tratamientos y con tus explicaciones en las reuniones de las 7.30 de la mañana. Pero sobre todo me llevé a una gran amiga; y que, a pesar de la distancia,

hemos mantenido todo este tiempo nuestra amistad. Conocerme ha sido uno de los mejores regalos de Madrid, sin duda!

Y que decir de ti **Ricardeteeeee???!!!** Si es que Ricardo es ese chico de que todas las mujeres se enamoran! Por tu manera de ser, por tu generosidad y buen humor, tu manera de enseñar, trabajador como tu sólo, una gran pérdida para el departamento de Anatomía, sin duda. Pero, yo tuve la suerte de trabajar a tu lado en este proyecto. Siempre dando ánimos y transmitiéndome positividad. Es que trabajar a tu lado es todo un lujo, de verdad, un lujo tremendo. Yo puedo presumir de ello. Y parte de esto también es tuyo, lo sabes. Te quiero mucho super majo!!! Gracias Cararito!!! *Equipo TMA!!!*

Por supuesto, no me voy a olvidar de ti, **Alberto**. El que me ha enseñado a cortar las muestras con todo el arte del mundo, siempre una sonrisa, un arte que no se puede aguantar. ¡¡¡Lo que nos hemos reído Alberto!!! Tenías esa virtud: la de sacarme una sonrisa cuando las cosas iban mal abajo, y tener eso es todo un privilegio. Muchísimas gracias por estos años que hemos compartido. Parte de este trabajo también te lo debo a ti.

Y ¿qué decir de vosotros?, **Rafita, Barbie, Ricardo, Nuri, Belenchu, y todos los técnicos de AP** que formáis una familia increíble en ese departamento y que da gusto estar con vosotros. Trabajar a vuestro lado es un placer, ¡ojalá el resto de lugares en los que trabaje tengan solamente un poquito de lo bueno que tenéis vosotros! Gracias chicos, os llevo en el corazón.

También quiero agradecer a **Nacho** y a **Jorge** por vuestras “*proposiciones indecentes*”, por las tardes en la sala de tallados y por nuestras conversaciones en el despacho. En serio chicos, sois la leche! Os quiero un montón.

Y no quiero terminar de hablar de AP sin mencionar a **María Jesús Fernández Aceñero**, porque trabajar con ella ha sido otro de los regalos que me ha brindado esta etapa en Madrid. Todo un placer Doctora!

También me gustaría mencionar a **Óscar**, mi compi de al lado. No vemos las cosas de igual manera, pero han sido muchas las conversaciones, las cenas de laboratorio en el Pizza Jardín, etc. *Ovnis e Illuminatis*, clips de “*famobil*” Todo un personaje! Quizás tenga que darte la razón en ciertas cosas. Gracias Óscar por los momentos vividos!

A ti **Raúl**, por darme mi apodo “*Lady Cortijo*”, por cantar constantemente las canciones de Eurovisión y por tus bailes; en definitiva, por hacerme reír y pasarlo bien en la *Foncicueva*. En serio, te guardo un gran cariño.

A mi **Morrita!!!** Gabyyyy!!! Ayyyy!!! si de casualidad me encontré a una hermana mejicana en Madrid!!! ¿Que decirte mi niña? Que conocerte ha sido una de las mejores cosas que me ha pasado

en la vida. Todo un ejemplo a seguir, trabajadora como tu sola. Rebosante de clase y de buen gusto. Toda una “*crack*” Morrita!!! Gracias por toda la energía positiva que me diste, toda la fuerza, por aquella Navidad en la que te convertiste en parte de mi familia. Nos vemos pronto ¡Seguro!

A todas las personas que me donaron sangre para esta tesis doctoral (**Marlid** y **Andrea** entre otros), pero muy en especial al “**Doctorsito**”. Gracias **Juan Pablo** por toda tu ayuda. No sólo donaste sangre para los experimentos, sino también para la puesta a punto. ¡Menos mal que mides 2 metros y derramar tanta sangre a penas te afecta! En serio, mil gracias por toda tu ayuda y por poner un toque de buen humor en este trabajo, con esa voz de telenovela latina que Dios te ha dado.

Al Departamento de **Citogenética**: quiero agradeceros vuestra ayuda en la fase experimental *in vitro*, por enseñarme a tratar mi células NKs y porque siempre estabais dispuestos a colaborar con una sonrisa. Gracias!

A Santi. Por esos pedazo de cafés! Por colarnos en tantas colas, por tener siempre esa sonrisa en la cara, por tu trato siempre amable y divertido. ¡¡¡Gracias Santi!!! Sin duda la Fundación no sería lo mismo sin ti.

A los oncólogos del *Oncohealth Institute*, en especial a vosotros: **Irene, Tatiana, Andrea, Víctor, Gloria, Iñaki, Ana León, Dómine, Paco Lobo, Victoria, Yann, Brezo**, etc. Y a **Berta** y a **Carmen**. Porque cuando llegamos nos acogisteis con todo el cariño del mundo. Porque nos habéis enseñado bastante de oncología, por nuestras reuniones de *Journal Club* y porque siempre da gusto pasar a saludaros y siempre estáis dispuestos a echar una mano. ¡¡¡Gracias Oncólogos!!!

Por otra parte, quisiera agradecer a personas que no han estado involucradas en mi día a día laboral, pero que han desempeñado un papel muy importante en mi bienestar y salud mental de mi etapa Madrileña:

A mi familia Madrileña: a **Tere, Manolo, Víctor, Gonzalo y Jaime**; así como a **Eva, Rebeca y Ruth**. Especialmente a **Tere y Manolo**, mis “*padres madrileños*”. Gracias por acogerme en vuestra casa de la noche a la mañana. Siempre la he sentido un poco mía con ese calor de familia tan importante cuando estás en un lugar nuevo, un trabajo nuevo y una etapa nueva. Esas cenas con Tere, las visitas a Manolo; todo lo que he vivido en vuestra casa me lo quedo para mí. Porque realmente ha sido un hogar. Tere tus cuidados han sido exquisitos, tus detalles, nuestras conversaciones, creo que eso es lo más importante que me voy a llevar de Madrid. La oportunidad

de haber vivido allí arropada por mi familia. Y a Manolo ¿que le puedo decir? Ha sido tan duro como bonito acompañarte en tus últimos años de vida. Ver el ejemplo de cómo te cuidaba tu mujer, ver esa sonrisa que siempre tenías para mí cuando ya no sabías ni quien era ¿o igual sí...? Eso no lo sabremos, pero me quedo con esos ojos brillantes y esa sonrisa tan especial cuando me veías aparecer por la residencia. Eso no tiene precio. Y a vosotros chicos..., ¿Que os voy a decir? ya sabéis lo que os quiero, solo darle las gracias a Víctor por ayudarme con tu *super piso*. Así como a Jaime por esas navidades tan especiales y a Gonzalo por tus constantes visitas para no perdernos de vista. ¡¡¡Os quiero familia!!! No hay palabras para agradeceros lo que habéis supuesto para mi estos años. ¡¡¡Os quiero!!!

A ti, **Cuqui**, una de mis mejores amigas y compañera de aventuras en estos últimos trece años. Hemos compartido carrera, vivencias en Pamplona, en el sur y en Madrid. Me has apoyado en cada momento de la etapa madrileña, dándome fuerzas cada semana con nuestras quedadas, nuestras conversaciones. Un día me dijiste: *Aurita, o acabas con la Tesis o la Tesis acaba contigo*. Cuqui..., ¡¡¡Gané!!! He acabado con ella. Gracias por ser mi incondicional. No se puede ser mejor amiga que tu, ni más divertida y creativa. Te quiero muchísimo y sé que sin tus fuerzas este trabajo no habría llegado a su fin. Gracias **Covi**.

Marta, sin duda otra sorpresa de esta etapa. ¿Quién nos iba a decir que *un Mini* nos iba a unir? Si, Si, tu Mini. Compañera de viajes semanales. No veía la hora de que llegase el viernes por la tarde. Has hecho que prefiera tragar 5 o 6 horas de carretera antes que pillar un AVE. Y es que, me encontré por el camino a una amiga con la que tomar ese café de 5 horas sentada en tu Mini. Gracias Marta, por tus viajes llenos de conversaciones buenas, por tu generosidad siempre, por nuestras escapadas por Madrid y por seguir estando ahí.

A **Maca**, ¿es curioso que en Madrid hablásemos a diario y que ahora que nos separan muy pocos kilómetros a penas nos veamos! Pero eso da igual amiga, porque para nosotras no hay tiempo. Da igual el tiempo que pase, las historias para no dormir que nos pasen... Luchadora incansable de mil batallas tremendas, superviviente extrema. Mi angelito de la guarda. Esta Tesis no hubiese sido posible tampoco sin tus llamadas, sin tu aliento ni sin tu ejemplo. ¡¡¡Gracias amiga!!!

Al todo el **Cortijo Olivera**, en especial a **Pepín**, a **Mari**, a **Cristobal**, **Vanessa** y en especial a mi amigo **Jacobo**. Porque habéis sido un chorro de aire fresco para descongestionar la mente. Mi pasión: los caballos. Y no podría haber superado esta etapa sin ellos y sin vuestra compañía. Salir a enganchar por el campo, ayudar con el ganado, las clases de los niños, las conversaciones con Mari... ha sido aire fresco. Y todo esto te lo debo a ti Jacobo, más que un amigo eres un hermano. Sabes que te quiero, ¡¡¡lo sabes!!! pero nunca podré agradecerte en la medida que te mereces, la oportunidad que me diste dejándome formar parte del Cortijo Olivera. ¡¡¡Gracias amigo!!!

A mis cortijeros: **Ana, Manu y Manolo**. ¿Qué puedo deciros? ¡Que sois personas necesarias en mi vida! Que con vuestro cariño y apoyo, nuestras quedadas y nuestro pasado, os habéis convertido en mi familia especial, que nos une la pasión por los caballos y mil batallas en estos veintitantos años de amistad. ¡¡¡Gracias por estar ahí!!!

A **Vicky y María Álvarez**: mis hermanas de Pamplona. Aunque ninguna de nosotras seamos de allí, podemos decir que somos las “*Divinas por el Mundo*”. Pamplona, Galicia, Santander, México, Sevilla y Londres se unen para dar forma a una mezcla de culturas que nos unieron, nos unen y nos mantendrán unidas. Porque hemos convivido como familia, hemos pasado momentos increíbles y también algún que otro bache. Pero la resultante de todo esto es una amistad que va mucho más allá precisamente de eso. La distancia no puede con nosotras, ni nada que se nos ponga por delante. Basta un mensaje o llamada para activar al *equipo de las Divinas*. ¡¡¡Amigas, hermanas, gracias por aguantar estos años de chaparrón y animarme a terminar!!! Creo que todas en un momento dado perdimos la fe en esto, pero finalmente se ha resuelto. Una parte de esto también os lo debo a vosotras. ¡Os quiero! Ahhh y a **Toni**! Que yo sé que él se alegra muchísimo de que haya llegado a su fin este trabajo. ¡Ojalá algún día pueda seguir tus pasos Toni!

A **Don Francisco**, podríamos llamarle también el Santo Job..., porque tiene una paciencia tremenda y un corazón enorme. ¿No sé como no le ha saltado ningún tornillo de la cabeza en alguna de nuestras conversaciones...? ...porque soy intensa como yo sola y algún día voy a volverle loco. Ahora en serio, gracias por todos los consejos: tanto de Tesis como de los que no lo son. Por orientarme y guiarme en el camino, por los ánimos y el aguante tan grande y la paciencia que tiene conmigo. Por todo ello, también ¡va por usted! Muchas gracias Don Francisco, sin usted, lo sabe, esto no habría salido.

Taro, Feli Chabela y en especial a mi amiga Esperanza, porque me habéis acompañado en la misma tarea en distintas etapas de mi vida, haciendo de mi una mejor persona y una mejor *curranta*. Gracias chicas porque vuestro trabajo ha sido de fondo, *desde el fondo* (quizá el más importante). Al final gracias a vosotras soy la que soy y he conseguido acabar esto porque, como vosotras me diríais: *Empezar es de todos...* ¡¡¡Gracias!!!.

A **Remi y Fernando**. La verdad que más que amigos de mis padres o amigos propios... sois mi familia, así os sentí desde chiquitilla. Esperando con ilusión cada vuelta de Pamplona para ir a comer “al Faro” con vosotros o simplemente echar un día de playa. Me encantaba estar con vosotros y lo máximo llegaba cada Domingo de Ramos que hemos pasado en familia. Y es que habéis significado tanto para mí... Además, ¡compañeros de profesión! Nunca olvidaré tu despedida Fernando “*Tienes que terminar la Tesis Áurea*”, pues aquí la tienes, dedicada para ti y tu mujer. Remi, siempre me voy a quedar con esa pena de no haberte dicho Adiós. Yo sé que ya me lo has perdonado, y sé que estás de fiesta hoy sabiendo que este duro camino ha llegado a su

fin. Sabes de sobra la tarea que desempeñaste en ello y hoy quiero daros a ti y a Fernando un lugar en ella. Hoy la vais a escuchar desde un lugar muy privilegiado y espero que estéis muy orgullosos de que haya finalizado. Por supuesto, no me cabe duda de que un gran impulso ha sido vuestro. Gracias “*titos*”. ¡Os llevo en el alma!

A ti **Madrina**, a ti **Fina**... Sé que hoy me oyes desde el cielo, al que llegaste del *tiritirón*! Además, dando bastante guerra aquí abajo y llenándome de favores y bendiciones. Un día hablando contigo por teléfono te dije que estaba en un mal momento pero que iba a ofrecer terminar esta Tesis por ti, por tu enfermedad y por los tuyos... y yo sé que no cae en saco roto. Tu te tuviste que ir, pero estoy segura de que este trabajo ha servido y que en gran medida ha salido gracias a ti. ¡Gracias Madrina!

A mis *titos* **Terry** y **Mari**, a mis primos **David**, **Laura** y **Stef**... en especial a **Stef** y **David**. Porque de las palabras “primos hermanos” me quedo con la de hermanos. Siempre ahí, de manera incondicional, con vuestro apoyo en los peores momentos y nuestras celebraciones en el restaurante americano en las que nos partimos de risa, o en “La Caña” viendo fuegos artificiales. Bul, nunca olvidaré el día que me mandaste esa canción de REM: “Everyday is yours to win”. Creo que define a la perfección el tipo de relación que nos une. Stef, a ti qué te voy a decir si ¡soy tu chinchorra! ¡¡¡Que os quiero!!! Y que gracias por vuestro aliento estos años de Tesis.

A ti, que apareciste de repente, sin previo aviso, formando parte de *un plan perfectamente trazado*. Siempre digo que “*las personas que no estén en mi lucha no van a estar en mi victoria*”, y tu estás en mi lucha, en la diaria, en esa lucha de cumplir sueños que no todo el mundo entiende. Y por ello, hoy has de estar aquí. “*Los tiempos de Dios son perfectos*”, y reapareciste justo ahí, en el momento en el que tenía que ser. Aunque ambos sabemos que siempre estuviste..., *estuvimos*. Gracias por dar color a mi vida y llenarla de ilusión, por valorarme y darme fuerzas para seguir luchando, por quererme y querer también esa parte tan *hormiguita* mía, porque somos así, VALIENTES. Y como ya he dicho, esta victoria que se llama doctorado también es tuya de alguna manera. ¡Vamos equipo! #P&A.

RESUMEN

El anticuerpo monoclonal anti-IgG1 cetuximab es una terapia que bloquea al receptor EGFR de las células tumorales, lo que le convierte en una terapia eficaz debido al bloqueo de la ruta molecular de las MAPK responsable de la proliferación y supervivencia celular. Además, este fármaco posee la capacidad de activar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC) desencadenada por las células NK del propio paciente. Lo interesante de activar la ADCC, es que este mecanismo es independiente de las mutaciones activadoras tanto de *KRAS* y *BRAF*, como de cualquier otra activación de la ruta de las MAPK por debajo del EGFR. Uno de los factores que van a determinar una mayor interacción con la fracción constante del anticuerpo cetuximab es el tipo de polimorfismo presente en el receptor de la fracción constante de las inmunoglobulinas presentes en la membrana de las células efectoras, en concreto *FcγRIIIa* y *FcγRIIIa*. Además, sabemos que existen otros receptores en las células NK conocidos como receptores KIR. No todos los receptores KIR son activadores de la función de las células NK ya que estas moléculas son polimórficas. Por esta razón, nos planteamos estudiar que polimorfismos tanto en los receptores *FcγR* como en los genes *KIR* serían buenos marcadores predictivos de una mayor respuesta al cetuximab a través de la activación de la ADCC. Para ello, diseñamos un ensayo clínico multicéntrico en el que reclutamos 70 muestras de pacientes con cáncer colorrectal metastásico con mutación de *KRAS*, expresión del EGFR y con el polimorfismo favorable *FcγRIIIa*-131H/R que fueron tratados con cetuximab. Sobre estas muestras evaluamos la expresión de los polimorfismos en el gen de *FcγRIIIa* y en los genes *KIR*. Tras evaluar los polimorfismos de *FcγRIIIa* (*V158F*, *V158V* y *F158F*) en nuestra cohorte de pacientes, no encontramos asociación con la supervivencia de los pacientes tratados con cetuximab. Sin embargo, encontramos una alta tendencia hacia la significancia con respecto a la supervivencia global asociada al gen *KIR2DS4* ($P=0.071$). Profundizando en las variantes del gen *KIR2DS4*, encontramos que la variante completa (*KIR2DS4-full*) presentaba un peor pronóstico comparada con la variante con el receptor no funcional (*KIR2DS4-RNF*) ($P=0.030$).

Posteriormente, diseñamos un modelo *in vitro* para validar la asociación entre los polimorfismos favorables encontrados y la capacidad de activación de la ADCC de las células NK mediante el cetuximab. Para ello, co-cultivamos la línea celular derivada de cáncer colorrectal con mutación de *KRAS*, LS147T, junto a células NK aisladas de donantes sanos positivas para los polimorfismos favorables descritos previamente. Interesantemente, los genotipos favorables con *FcγRIIIa*-131(H/H ó H/R) y la variante delecionada que resulta en un receptor no funcional, *KIR2DS4del*, presentaron una mayor tasa de activación de ADCC mediada por el anticuerpo cetuximab.

ABSTRACT

The anti-IgG1 monoclonal antibody cetuximab is a therapy that blocks the EGFR receptor of tumor cells. This treatment is an effective anti-neoplastic therapy to block the MAPK molecular pathway involved in cell proliferation and survival. In addition, this drug is able to activate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) triggered by NK cells. Interestingly, ADCC mechanism is independent of both *KRAS* and *BRAF* activating mutations, and other activating factors of the MAPK pathway downstream EGFR. One of the factors that could determine the interaction between cetuximab's IgG1 constant fraction is the polymorphism expressed in the cell membrane of effector T-cells called gamma chain receptor of immunoglobulin constant fraction receptor of the immunoglobulins (FcγRIIa and FcγRIIIa). In fact, it is known that in NK cells there are other receptors known as KIR receptors. Not all KIR receptors are activators of NK cell function since these molecules are polymorphic. For this reason, we based our study on the polymorphisms expressed in *FcγR* and *KIR* and dissected whether they could be good predictive markers of cetuximab response through ADCC activation. For this, we designed a multicentre clinical trial and recruited 70 samples from patients with metastatic colorectal cancer with *KRAS* mutation, EGFR expression and the previously described *FcγRIIa-131H/R* polymorphism as favorable for cetuximab response. On these samples, we evaluated the expression of the polymorphisms in *FcγRIIIa* and in the *KIR* genes. After evaluating the polymorphisms of *FcγRIIIa* (*V158F*, *V158V* and *F158F*) in our patient cohort, we found no association with patient survival after cetuximab treatment. However, we found a high trend towards significance between overall survival and *KIR2DS4* ($P = 0.071$). Further research on this gene revealed that full variant (*KIR2DS4-full*) showed a worse prognosis compared to the variant with the non-functional receptor (*KIR2DS4-RNF*) ($P = 0.030$).

Subsequently, we designed an *in vitro* model to validate the association between the favorable polymorphisms previously found, and the activation of ADCC by cetuximab. Then, we co-cultured a colorectal cancer derived cell line that carries *KRAS* mutation, LS147T, together with NK cells isolated from healthy donors tested to be positive for favorable polymorphisms. Interestingly, *FcγRIIa-131* (*H/H* or *H/R*), and the deleted variant gene that translate a non-functional receptor, *KIR2DS4del*, showed a higher activation rate of ADCC mediated by cetuximab antibody.

ÍNDICE

1.	Introducción	<i>página 22</i>
1.1	Epidemiología del cáncer colorrectal (CCR)	<i>página 22</i>
1.2	Causas y síntomas del CCR	<i>página 23</i>
1.3	Diagnóstico del CCR	<i>página 24</i>
1.3.1	Sistema de estadiaje “TNM”	<i>página 25</i>
1.4	Enfermedad Metastásica	<i>página 27</i>
1.5	Bases Moleculares del CCR	<i>página 27</i>
1.5.1	Ruta molecular de las <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (MAPK)	<i>página 28</i>
1.6	Subtipos del CCR	<i>página 30</i>
1.6.1	Subtipos moleculares del CCR	<i>página 31</i>
1.7	Tratamiento del CCR	<i>página 33</i>
1.7.1	Cirugía	<i>página 33</i>
1.7.2	Tratamiento adyuvante del CCR	<i>página 34</i>
1.7.3	Tratamientos Biológicos	<i>página 35</i>
1.8	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)	<i>página 36</i>
1.8.1	Células asesinas naturales (NK)	<i>página 37</i>
1.8.2	Receptores FcγRIIa y FcγRIIIa	<i>página 38</i>
1.8.3	Receptores KIR	<i>página 39</i>
2.	Hipótesis	<i>página 41</i>
3.	Objetivos	<i>página 41</i>
4.	Materiales y Métodos	<i>página 42</i>
4.1	Muestras de pacientes	<i>página 42</i>
4.1.1	Criterios de inclusión y reclutamiento de los pacientes	<i>página 42</i>
4.1.2	Cálculo del tamaño muestral	<i>página 43</i>
4.1.3	Extracción de ADN tumoral a partir de bloques de parafina	<i>página 44</i>
4.1.4	Determinación de mutaciones del gen <i>KRAS</i>	<i>página 44</i>
4.1.5	Extracción de ADN somático para la determinación de los polimorfismos <i>FcγRIIa</i> H131R y <i>FcγRIIIa</i> V158F	<i>página 45</i>
4.1.6	Determinación de los polimorfismos <i>FcγRIIa</i> H131R y <i>FcγRIIIa</i> V158F	<i>página 45</i>
4.1.7	Determinación del EGFR en el bloque tumoral	<i>página 46</i>
4.1.8	Determinación de polimorfismos de los genes <i>KIR</i> de las células NK (<i>Natural Killer</i>)	<i>página 48</i>

4.2 Estudios <i>in vitro</i> para la determinación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)	<i>página 49</i>
4.2.1 Determinación de los polimorfismos <i>FcγRIIIa</i> , <i>KIR2DS4fd</i> , <i>KIR2DS4f</i> y <i>KIR2DS4d</i>	<i>página 50</i>
4.2.2 Cultivo Celular	<i>página 51</i>
4.2.3 Aislamiento de poblaciones linfocitarias mediante gradiente de densidad	<i>página 52</i>
4.2.4 Aislamiento de la población de células NK a partir de la serie leucocitaria total	<i>página 53</i>
4.2.5 Estimulación de células NK mediante IL-2	<i>página 54</i>
4.2.6 Determinación de la respuesta a ADCC <i>in vitro</i>	<i>página 54</i>
4.2.6.1 Preparación del co-cultivo	<i>página 55</i>
4.2.6.2 Medición de la citotoxicidad	<i>página 55</i>
4.3 Análisis estadístico	<i>página 55</i>
4.3.1 Análisis uni- y multi-variante de Cox con respecto a la supervivencia global y al tiempo a la progresión	<i>página 55</i>
4.3.2 Análisis de supervivencia	<i>página 56</i>
4.3.3 Análisis de asociación entre variables	<i>página 56</i>
4.3.4 Análisis estadístico de los experimentos <i>in vitro</i>	<i>página 57</i>
5. Resultados	<i>página 57</i>
5.1 Descriptiva de los pacientes	<i>página 57</i>
5.2 Características clínicas de los pacientes	<i>página 57</i>
5.3 Localización del tumor primario	<i>página 59</i>
5.4 Localización de la metástasis	<i>página 59</i>
5.5 Grado histopatológico (G) y clasificación TNM	<i>página 59</i>
5.6 Expresión del EGFR y estudio mutacional de <i>KRAS</i>	<i>página 61</i>
5.7 Análisis de CEA, β2M y LDH	<i>página 61</i>
5.8 Tratamiento de los pacientes	<i>página 62</i>
5.8.1 Administración del tratamiento	<i>página 62</i>
5.8.2 Tiempo de tratamiento y número de ciclos administrados	<i>página 62</i>
5.8.3 Número de ciclos administrados	<i>página 62</i>
5.9 Fin del estudio y fallecimiento de los pacientes	<i>página 63</i>
5.10 Análisis de supervivencia	<i>página 63</i>
5.10.1 Supervivencia global y tiempo hasta la progresión	<i>página 64</i>
5.10.2 Análisis de supervivencia de las variables clínicas	<i>página 66</i>

<u>5.10.3 Estudio de las metástasis</u>	<i>página 67</i>
<i>5.10.3.1 Estudio de la supervivencia global y tiempo a la progresión de los pacientes en función de la presencia de metástasis hepáticas</i>	<i>página 67</i>
<i>5.10.3.2 Estudio de supervivencia de los pacientes en función de la presencia de metástasis hepáticas o pulmonares de manera excluyente</i>	<i>página 68</i>
<i>5.10.3.3 Estudio de la supervivencia de los pacientes que solamente presentaban una metástasis en hígado o una metástasis en pulmón.</i>	<i>página 69</i>
<i>5.10.3.4 Estudio de la supervivencia de los pacientes en función de presentar una única metástasis hepática frente a una única metástasis pulmonar</i>	<i>página 71</i>
<u>5.10.4 Análisis de la supervivencia en función del polimorfismo <i>FcγRIIIa-V158F</i> y en función de los polimorfismos en los genes <i>KIR</i>. Implicación en la respuesta frente a ADCC mediada por anticuerpos IgG1.</u>	<i>página 71</i>
<u>5.10.5 Análisis de supervivencia relativo a los distintos polimorfismos de los genes <i>KIR</i></u>	<i>página 72</i>
<i>5.10.5.1 Análisis de supervivencia de los pacientes respecto a las distintas variantes del polimorfismo <i>KIR2DS4</i></i>	<i>página 73</i>
<i>5.10.5.2 Análisis multivariante por regresión de los riesgos proporcionales de Cox para las variantes alélicas del gen <i>KIR2DS4</i></i>	<i>página 76</i>
<u>5.10.6 Estudio de las variantes alélicas del gen <i>KIR2DS4</i> en relación con la reacción cutánea del tratamiento</u>	<i>página 76</i>

5.11 Estudio de la activación de la ADCC por parte del cetuximab mediante modelos *in vitro* *página 79*

6. Discusión	<i>página 82</i>
7. Conclusiones	<i>página 87</i>
8. Bibliografía	<i>página 88</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomía del colon. *página 22*
- Figura 2.** Modelo de carcinogénesis del CCR. *página 28*
- Figura 3.** Porcentaje de mutaciones en *KRAS* en exón dos y en todas las mutaciones en *RAS*.
Página 29
- Figura 4.** Cascada de señalización MAPK en CCR. *página 30*
- Figura 5.** Antigua clasificación molecular CCR. *página 31*
- Figura 6.** Nueva clasificación molecular propuesta para los subtipos moleculares del CCR.
página 33
- Figura 7.** Representación esquemática de las funciones de las células NK. *página 37*
- Figura 8.** Familia de receptores FcγR. *página 38*
- Figura 9.** Tipos de Receptores KIR. *página 40*
- Figura 10. 10a.** Imagen de la preparación de muestras para el Rotor-Gene Q. 10b. Imagen del Rotor-Gene Q. *página 45*
- Figura 11.** Esquema explicativo de la unión de sondas vic y fam para los polimorfismos *FcγRIIa* y *FcγRIIIa*. *página 46*
- Figura 12.** Expresión de EGFR en los bloques tumorales parafinados de pacientes. *Páginas 47-48*
- Figura 13.** Geles de electroforesis de los genes *KIR*. *página 49*
- Figura 14.** Imagen esquemática de los experimentos *in vitro* para la determinación de la ADCC.
página 50
- Figura 15.** a) Imagen del equipo termociclador utilizado. b) Condiciones aplicadas a la PCR.
página 51
- Figura 16.** Imagen de las células LS147T a distinto grado de confluencia. *página 51*
- Figura 17.** a) Vacutainer con heparina de sodio, b) Ficoll Paque y c) Tubos con la muestra antes y después de realizar la técnica. d) Imagen de cámara de Neubauer. *página 52*

- Figura 18.** Imagen esquemática del proceso de aislamiento de células NK usando la metodología MACS (*Magnetic Associated Cell Sorting*) de Miltenyi. *página 53*
- Figura 19.** Figura esquemática del diseño de la placa de 96 pocillos para el experimento de medición de citotoxicidad. *página 54*
- Figura 20.** Análisis de supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio. *página 66*
- Figura 21.** Análisis de supervivencia de los pacientes en función de la presencia de metástasis hepáticas. *página 68*
- Figura 22.** Análisis de supervivencia de los pacientes en función de la presencia de metástasis hepáticas o pulmonares. *página 69*
- Figura 23.** Análisis de supervivencia de los pacientes en función de la presencia de metástasis hepáticas, pulmonares o en varios sitios metastásicos. *página 70*
- Figura 24.** Análisis de supervivencia de los pacientes en función de presentar una única metástasis hepática frente a una única metástasis pulmonar. *página 71*
- Figura 25.** Análisis de supervivencia de los pacientes en función de las distintas variantes del polimorfismo *KIR2DS4*. *página 73*
- Figura 26.** Análisis de supervivencia por log-rank de los pacientes en función de las variantes alélicas de *KIR2DS4*. *página 74*
- Figura 27.** Análisis de supervivencia por log-rank de los pacientes en función de las variantes *Full/Del* y receptor no funcional (RNF). Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global. *página 75*
- Figura 28.** Análisis de supervivencia según la reacción cutánea de los pacientes tras el tratamiento con cetuximab. *página 77*
- Figura 29.** Análisis de supervivencia de los pacientes en función del polimorfismo *KIR2DS4* estratificados por presentar reacción cutánea. *página 78*
- Figura 30.** Imágenes representativas correspondientes a tres pacientes con distinto polimorfismo en *FcγRIIIa*. *página 80*
- Figura 31.** Imagen de los geles de agarosa al 2%, donde se puede observar los distintos genotipos correspondientes al gen *KIR2DS4*. *página 80*
- Figura 32.** Respuesta ADCC por linfocitos de donantes sanos en co-cultivo con células tumorales en presencia de cetuximab. *página 81*
- Figura 33.** Respuesta a ADCC por linfocitos procedentes de donantes sanos en co-cultivo con la línea celular tumoral derivada de cáncer colorrectal LS147T en presencia de cetuximab. *página 81*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nuevos casos y muertes estimadas por sexo en EEUU, 2018.	<i>página 23</i>
Tabla 2. Clasificación T (Sistema de estadiaje “TNM”).	<i>página 25</i>
Tabla 3. Clasificación N (Sistema de estadiaje “TNM”).	<i>página 25</i>
Tabla 4. Clasificación M (Sistema de estadiaje “TNM”).	<i>página 26</i>
Tabla 5. Clasificación por estadios (Sistema de estadiaje “TNM”).	<i>página 26</i>
Tabla 6. Centros hospitalarios participantes del estudio clínico y número de pacientes reclutados por cada centro. <i>Páginas 42-43</i>	
Tabla 7. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.	<i>página 58</i>
Tabla 8. Características morfológicas de los pacientes.	<i>página 58</i>
Tabla 9. Localización del tumor primario.	<i>página 59</i>
Tabla 10. Localización de las metástasis.	<i>página 59</i>
Tabla 11. Grado histopatológico y estadificación TNM de los pacientes reclutados en el estudio. <i>página 60</i>	
Tabla 12. Mutaciones de <i>KRAS</i> .	<i>página 61</i>
Tabla 13. Intensidad de EGFR.	<i>página 61</i>
Tabla 14. Determinación de CEA, β2M y LDH en los pacientes con CCRm.	<i>página 62</i>
Tabla 15. Número de ciclos administrados.	<i>página 62</i>
Tabla 16. Tiempo desde el diagnóstico de los pacientes incluidos en el ensayo clínico y tiempo de seguimiento de los pacientes incluidos en el ensayo. <i>página 64</i>	
Tabla 17. Análisis de la supervivencia global.	<i>página 65</i>
Tabla 18. Análisis del tiempo hasta la progresión de los pacientes incluidos en el ensayo clínico. <i>página 65</i>	
Tabla 19. Análisis univariante de regresión de Cox para supervivencia global y tiempo hasta la progresión con las variables clínico-patológicas registradas en el estudio. <i>página 66</i>	
Tabla 20. Frecuencias de los polimorfismos <i>FcγRIIa (H131R)</i> , <i>FcγRIIIa (V158F)</i> y los genes <i>KIR (KIR2DS4)</i> de los pacientes incluidos en el estudio. <i>página 72</i>	
Tabla 21. Análisis de regresión de Cox para las distintas variantes de los polimorfismos en el gen <i>KIR</i> y el polimorfismo <i>FcγRIIIa-158F/V</i> con respecto a la supervivencia global y el tiempo hasta la progresión. <i>página 73</i>	
Tabla 22. Análisis de supervivencia global en función de las variantes heterocigótica (F/D; <i>full/del</i>) o sin receptor funcional (RNF) del gen <i>KIR2DS4</i> . <i>página 75</i>	
Tabla 23. Análisis multivariante por regresión de Cox respecto a la supervivencia global. <i>página 76</i>	
Tabla 24. Supervivencia global de los pacientes en función de la reacción cutánea tras el tratamiento con cetuximab. <i>página 77</i>	

Tabla 25. Tiempo hasta la progresión de los pacientes en función de la reacción cutánea tras el tratamiento con cetuximab. *página 77*

Tabla 26. Datos de la supervivencia global de los pacientes con reacción cutánea en pacientes con receptor funcional del gen *KIR2DS4* para las variantes alélicas heterocigóticas (*Full/Del*) vs. pacientes sin receptor funcional (RNF). *página 78*

CLAVE DE ABREVIATURAS

- ADCC: “*antibody-dependent cell cytotoxicity*”
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- β2M: Beta 2 microglobulina
- CEA: Antígeno carcinoembrionario
- CCRm: cancer colorrectal metastasico
- ECOG: “*Eastern cooperative oncology group*”
- EDTA: Ácido etyldiamina tetra-acetico
- EGFR: Receptor Epidérmico de crecimiento
- Fc: Fracción constante
- FcγRIIIa: fracción constante gamma del receptor 3a
- FcγRIIa: fracción constante gamma del receptor 3a
- FNR: Receptor no funcional
- H/R: Hystidina/Arginina
- HR: *Hazard ratio*
- IC: Intervalo de confianza
- IgG1: Immunoglobulina G1
- ITIMs: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*
- KIR: Receptor “*Natural killer*”
- KIR2DS4fd: Receptor “*killer immunoglobulin 2DS4 full y del*”.
- KIR2DS4: “*Natural killer receptor*” 2DS4
- KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- MAPK: “*Mitogen-Activated Protein kinases*”
- Mg/m²: Milligramos/área
- ml: Mililitro
- NK: células “*Natural killer*”
- OS: Supervivencia global
- PFS: Supervivencia libre de progresión
- V/F: Valina/Phenilalanina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) es el tipo de cáncer que se da en el colon o intestino grueso y el recto. Se trata de la última porción del tracto digestivo que mide aproximadamente 1,5 m y se extiende desde el final del intestino delgado hasta el ano. Consta de diferentes partes: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, sigma y recto.

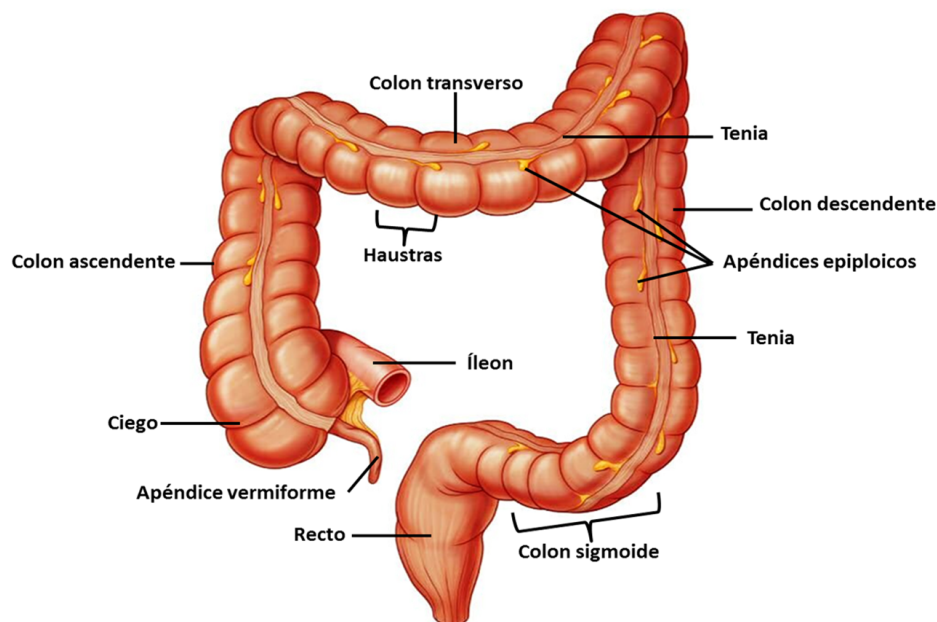


Figura 1. La imagen representa la anatomía del colon. La principal función del colon ascendente y del colon transverso es la absorción de agua y electrolitos, y la función del colon descendente-sigma y recto es almacenar las heces hasta la defecación. Imagen tomada de <http://www.cancerenpositivo.org>.

El CCR es el segundo tipo de cáncer más frecuente diagnosticado en mujeres seguido del cáncer de mama, el tercero en hombres tras el cáncer de pulmón y el de próstata, y el tercero en ambos sexos tras el cáncer de pulmón y el de mama. La tasa de incidencia estandarizada del cáncer colorrectal para ambos sexos supone un 17,2% con 1.360.602 casos a nivel mundial para el año 2012¹.

La incidencia de CCR en EE.UU son más altas en nativos de Alaska y población negra no hispanica, y de las más bajas en poblaciones asiáticas e isleñas del Pacífico y población hispana. Además, la incidencia de CCR es un 10-15% más altas en hombres que en mujeres². En Estados Unidos el número de nuevos casos para ambos sexos es de 148.830 y el número estimado de

mueres anuales es de 51.790 (Tabla 1)². Asimismo, el CCR representa aproximadamente 1.400.000 casos nuevos y aproximadamente 700.000 muertes en todo el mundo³. Por todo ello, el estudio en profundidad de esta enfermedad supone un objetivo primordial para su detección precoz y tratamiento de la misma.

Tabla 1. Nuevos casos y muertes estimadas por sexo en Estados Unidos en 2018².

LOCALIZACIÓN	NUEVOS CASOS ESTIMADOS			MUERTES ESTIMADAS		
	Ambos sexos	Hombre	Mujer	Ambos sexos	Hombre	Mujer
Colon	97.220	49.690	47.530	50.630	27.390	23.240
Recto	43.030	25.920	17.110	-	-	-
Ano, canal anal, Ano-recto	8.580	2.960	5.620	1.160	480	680

En España el CCR es el cáncer con mayor incidencia actualmente (15%) con 34.331 casos detectados en el 2017, seguido por el de próstata (13%), pulmón (12%) y mama (11%). En hombres, el cáncer colorrectal es el segundo más frecuente después del cáncer de próstata, seguidos por del cáncer de pulmón y por el de vejiga. En mujeres, el cáncer de mama es el más frecuentemente diagnosticado. En segundo lugar se sitúa el cáncer colorrectal seguido del cáncer de útero y del cáncer de pulmón. Con respecto a mortalidad, el primero en ambos sexos es el cáncer de pulmón, que genera 22.457 defunciones al año. El segundo es el cáncer colorrectal con 15.923 defunciones al año y el tercero el de páncreas, con casi 7.000 defunciones⁴.

1.2. CAUSAS Y SÍNTOMAS DEL CCR

Hasta el momento, no se ha descrito una causa concreta; sin embargo, se han descrito distintos factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la misma. Los factores genéticos o familiares suponen hasta un 25% de riesgo⁵. Por otro lado, los factores dietéticos, en especial el predominio de consumo de grasas, carnes rojas y procesadas, y una dieta pobre en fibra se ha considerado como factor de riesgo para padecer esta enfermedad⁶. Por último, las enfermedades que predisponen a padecer esta enfermedad, tales como la presencia de pólipos o enfermedades inflamatorias como el síndrome de Crohn o la colitis ulcerosa también se han catalogado como factores de riesgo⁷⁸.

El problema reside en que el 70-90% de los pacientes no presenta síntomas en estadios tempranos y son diagnosticados en chequeos de rutina^{9 10}. Los síntomas típicos de esta enfermedad incluyen: sangrado, dolor abdominal, anemia, distensión abdominal, náuseas y vómitos, siendo estos dos últimos indicadores de obstrucción intestinal⁹.

1.3. DIAGNÓSTICO DEL CCR

Se definen dos tipos de cáncer al diagnóstico: sincrónicos y metacrónicos. Los cánceres colorrectales sincrónicos se definen como dos o más tumores primarios separados por porciones de intestino normal y diagnosticados en menos de seis meses con respecto al diagnóstico del tumor inicial^{11 12 13}. Se entiende por neoplasia metacrónica aquella que aparece tras el diagnóstico de la neoplasia índice¹⁴ o cuando la neoplasia no estaba presente en la fase preoperatoria¹⁵.

Cuando existe una sospecha de esta enfermedad, las pruebas diagnósticas a realizar serían: la colonoscopia, el enema de bario o la tomografía computerizada de colon^{16 17}. En cuanto a la colonoscopia, se trata de la prueba diagnóstica más versátil y precisa para esta enfermedad. Esta técnica puede localizar la lesión, tomar biopsias, detectar neoplasias sincrónicas y eliminar pólipos. Además de las técnicas ya mencionadas, existe la posibilidad novedosa de diagnóstico mediante PILLCAM, recientemente aprobada por la FDA en los Estados Unidos, que se trata de una cápsula que es ingerida por los pacientes a los que no se les ha podido realizar la colonoscopia de manera completa y que no padezcan obstrucción intestinal^{18 19}.

Actualmente, el diagnóstico en el cáncer colorrectal incluye pruebas de laboratorio, ya que se han asociado múltiples marcadores serológicos. No obstante, los marcadores serológicos tienen una sensibilidad baja para detectar un tumor primario^{20 21 22 23}, en concreto el antígeno carcinoembrionario (CEA) tiene una sensibilidad del 46%²⁴, o el antígeno carbohidrato (CA) posee una sensibilidad del 30%. Además, el CEA es un marcador muy limitado ya que se encuentra elevado en muchas otras enfermedades y en personas fumadoras^{25 26}. Por esta razón, no están recomendados estos marcadores para su uso pronóstico^{21 27}; pero sí, están indicados para el seguimiento de los pacientes post-cirugía²¹.

Tras la resección quirúrgica, se realiza el examen histopatológico de la pieza de resección para conocer el estadio tumoral. Este estadiaje es el que va a permitir predecir el pronóstico y pautar el futuro tratamiento.

1.3.1. SISTEMA DE ESTADIAJE “TNM”

Se trata del sistema de estadiaje más usado internacionalmente para los tumores colorrectales y fue descrito por la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*²⁸. Este sistema describe tanto la carga tumoral como su diseminación en el cuerpo del paciente mediante las letras TNM. La letra T describe el tamaño del tumor y la diseminación del tumor hacia el tejido cercano (Tabla 2). La letra N describe la diseminación del cáncer hasta los ganglios linfáticos cercanos (Tabla 3). Por último, la letra M describe las metástasis (Tabla 4), es decir, la diseminación del tumor hacia otras partes del cuerpo.

Tabla 2. Clasificación T

T	TUMOR PRIMARIO
Tx	Tumor primario no puede ser valorado
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de lámina propia
T1	Tumor invade la submucosa
T2	Tumor invade la muscular propia
T3	Tumor invade a través de la muscular propia en los tejidos pericólicas
T4a	Tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral
T4b	Tumor invade o está adherido a otros órganos y estructuras

Clasificación T tomada de AJCC *Cáncer Staging Manual, Seventh Edition (2010)* publicada por Ed Springer New York²⁸.

Tabla 3. Clasificación N

N	GANGLIOS LINFATICOS REGIONALES
Nx	Ganglios regionales no pueden ser valorados
N0	No metástasis en ganglios regionales
N1	Metástasis en 1-3 ganglios regionales
N1a	Metástasis en 1 ganglio regional
N1b	Metástasis en 2-3 ganglios regionales
N1c	Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o en tejidos no peritonealizados pericólicos o perirrectales sin ganglios regionales afectados
N2	Metástasis en 4 o más ganglios regionales
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios regionales
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios regionales

Clasificación N tomada de AJCC *Cáncer Staging Manual, Seventh Edition (2010)* publicada por Ed Springer New York²⁸.

Tabla 4. Clasificación M

M	METÁSTASIS A DISTANCIA
M0	No metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis confinadas en un órgano o lugar
M1b	Metástasis en más de un órgano/lugar o en el peritoneo

Clasificación M tomada de AJCC *Cáncer Staging Manual, Seventh Edition (2010)* publicada por Ed Springer New York ²⁸.

En función de estos tres parámetros anteriores TNM, se realiza el estadiaje de los tumores (Tabla 5) lo que sirve como factor pronóstico de la enfermedad y para pautar los tratamientos oportunos. Aquí, los estadios iniciales del 0 al II implican que el tumor puede invadir cualquier capa del tejido colónico; mientras que los estadios III y IV indican que las células tumorales ya han afectado a algún ganglio linfático o a otros órganos vitales respectivamente. Desgraciadamente, hasta un 20% de los CCR que se diagnostican se presentan al inicio como enfermedad metastásica²⁹.

Tabla 5: Clasificación por estadios.

ESTADIO	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-4a	N1	M0
	T2-3	N2	M0
	T1-2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-4a	N2b	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Clasificación por estadios tomada de AJCC *Cáncer Staging Manual Seventh Edition (2010)* publicada por Ed Springer New York ²⁸.

1.4. ENFERMEDAD METASTÁSICA

La diseminación de las células tumorales puede ser vía linfática, sanguínea y transperitoneal. Los lugares más frecuentes a los que metastatiza este tipo de cáncer son: ganglios linfáticos, hígado, pulmones y peritoneo. Los pacientes pueden presentar síntomas referentes al área de afectación. Generalmente, los síntomas típicos de la enfermedad metastásica son: presencia de dolor en el cuadrante superior abdominal, distensión abdominal, saciedad temprana, adenopatía supraclavicular o nódulos linfáticos periumbilicales. Los pacientes que presentan síntomas en el momento del diagnóstico suelen tener una enfermedad más avanzada y un peor pronóstico^{9 30}. Las obstrucciones intestinales, así como las perforaciones, aunque no son frecuentes, acarrearán un mal pronóstico independientemente del estadio del tumor^{31 32 33 34 35}. Los tumores que presentan sangrado tienen mejor pronóstico, ya que se diagnostican en estadios más tempranos^{36 37}. Además cuando la enfermedad es metastásica se encuentra en el lado derecho presenta un peor pronóstico^{38 39}.

Debido a que el drenaje sanguíneo del tracto intestinal es vía portal, el primer sitio de diseminación del cáncer suele ser el hígado, seguido de los pulmones, huesos y cerebro. Sin embargo, se ha observado que los tumores presentes en la región distal del recto metastatizan de manera inicial a los pulmones, ya que la vena inferior rectal drena a la vena cava inferior, en vez de al sistema venoso portal⁴⁰.

1.5. BASES MOLECULARES DEL CCR

Ahondando en el mecanismo genético que subyace a la formación y desarrollo de este tipo de tumores, los autores Fearon y Vogelstein describieron por primera vez el modelo genético de la tumorigénesis colorrectal⁴¹ (Figura 2). A raíz de sus estudios, ellos describen el modelo de formación por pasos múltiples. Al menos, se tienen que dar tres pasos fundamentales: iniciación, promoción y progresión. Fundamentalmente, ellos estudiaron cuatro alteraciones genéticas en varios estadios: mutaciones en el gen *RAS*, deleciones en los cromosomas 5q, 17p y 18q. Además, observaron que más del 90% de los carcinomas tenían dos o más alteraciones. Sin embargo, solamente el 7% de los adenomas tempranos tenían más de una de las cuatro alteraciones. Y este porcentaje se incrementaba gradualmente desde el 25% al 49% cuando el adenoma progresaba de un estadio intermedio a estadios tardíos respectivamente. Vogelstein en el año 1989⁴², describió en un análisis más profundo que la mayoría de cánceres colorrectales tenían, al menos, una mediana de cuatro o cinco pérdidas alélicas por tumor. El modelo genético del desarrollo tumoral del cáncer colorrectal nos da una herramienta molecular para una estimación mejorada en el pronóstico de estos pacientes^{42 43}. Dentro del modelo genético del desarrollo tumoral del CCR

la activación del EGFR, que desencadena la ruta de proliferación y supervivencia de las MAPK, es una de las alteraciones más importantes.

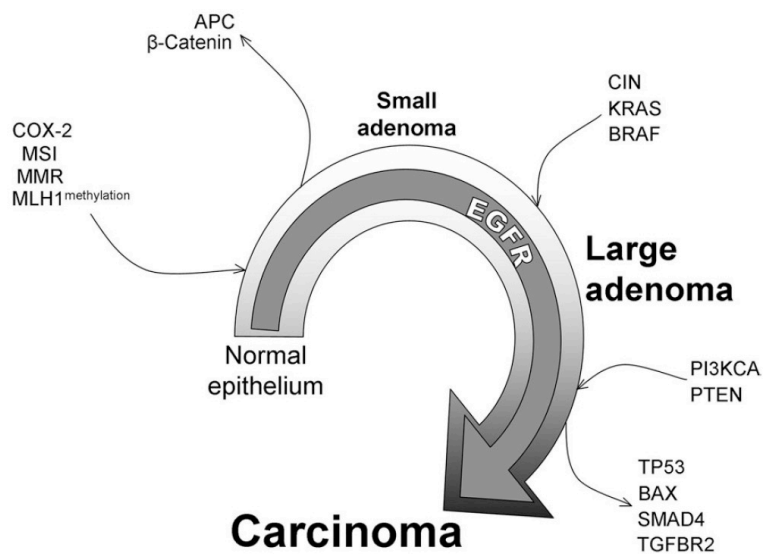


Figura 2: Modelo de carcinogénesis del CCR. Las flechas entrantes refieren efectores oncogénicos que son activados. Las flechas salientes hacen referencia a genes supresores de tumores que se inactivan en la transformación oncogénica ⁶.

1.5.1. RUTA MOLECULAR DEL LAS “*MYTOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES*” (MAPK)

Para el desarrollo de CCR e impulsar la ruta de las MAPK es esencial la activación del receptor EGFR “*Epidermal Growth Factor Receptor*”. También juega un papel importante en el desarrollo del CRC la ruta de PI3KCA-AKT (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) ^{44 45}. Aunque ambas rutas moleculares están conectadas por el receptor del EGFR ⁴⁶, también juegan un papel importante en la transmisión de la señal las proteínas RAS y BRAF (Figura 3 y Figura 4).

- Activación del EGFR

El factor de crecimiento epidérmico (EGFR) desempeña un papel clave en el crecimiento y la progresión del tumor mediante la promoción de una variedad de funciones que incluyen la proliferación, la supervivencia, la invasión o la evasión inmune⁴⁷. Pertenece a una familia de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa que incluyen EGFR (ERBB1), HER2/c-neu (ERBB2), HER3 (ERBB3) y HER4 (ERBB4). Los principales ligandos a EGFR son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), heparina que se une a EGF (HB-EGF), β -celulina, anfíregulina y heregulina. La interacción entre ligandos y receptor induce un cambio conformacional del EGFR que resulta en la activación de varias

cascadas de transducción de señalización implicadas en la proliferación, supervivencia, diferenciación y migración celular⁴⁷. Los dos principales efectores de la activación de EGFR son el “retrovirus-associated DNA sequences” (RAS), “murine leukaemia viral oncogene homologue” (RAF), “mitogen-activated protein kinase” (MAPK) que regula la progresión del ciclo celular, y “phospho-inositide-3 kinase” (PI3K)/“protein kinase B” (AKT) que controla la señal anti-apoptótica⁴⁷.

En la práctica clínica, la determinación de la expresión de EGFR por inmunohistoquímica fue crucial para la selección de pacientes que iban a ser tratados con cetuximab, ya que el cetuximab bloquea el efecto de la ruta molecular bloqueando al EGFR (NCT00079066)⁴⁸.

- Mutación en *RAS*

En sus tres isoformas: *HRAS*, *NRAS*, o *KRAS*, el oncogén *RAS* codifica proteínas transductoras de señal del mismo nombre en la cascada MAPK promoviendo la activación de esta vía de señalización⁴⁹. Dichas mutaciones están presentes en el 53% de los casos de CCR con valor predictivo de resistencia al tratamiento con anticuerpos biológicos anti-EGFR en casos metastáticos⁵⁰. La mutación más frecuente es de tipo puntual y se puede localizar en los codones 12 y 13 del exón 2 (42%), también los codones 58, 59 y 61 del exón 3, los codones 117 y 146 de exón 4 del gen *KRAS*; y en los exones 2, 3 y 4 de *NRAS* encontrando un 11% adicional de mutaciones con idéntico valor predictivo (Figura 3)⁵¹.

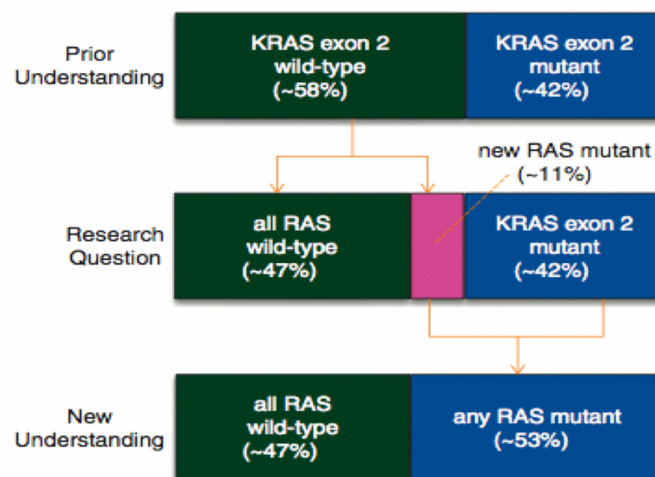


Figura 3. Porcentaje de mutaciones en *KRAS* en exón 2 y de todas las mutaciones en *RAS*⁵¹.

- Mutación en *BRAF*

El oncogén *BRAF* codifica para una proteína con actividad serina-treonina quinasa. La proteína RAS activa *BRAF* y desencadena la cascada de las MAPK que promueve la proliferación celular a través de la activación correlativa de la proteína MEK ⁴⁹ (Figura 4).

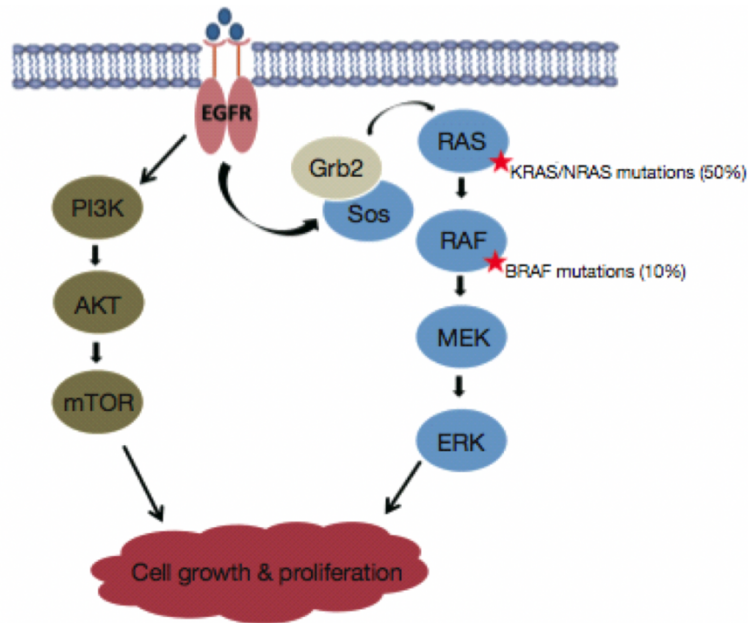


Figura 4. Cascada de señalización MAPK en CCR ⁴⁹.

La mutación *BRAFV600E* es la más frecuente (90% de los casos) y está ocasionada por el cambio de una timina por adenina en el nucleótido 1799 del dominio tirosina quinasa ⁵². Esta mutación está ampliamente demostrada con valor pronóstico en este tipo de cáncer ^{53 54 55 56 57 58}. Por otra parte, las mutaciones en *BRAF*, *NRAS* y *KRAS* son mutuamente excluyentes en esta enfermedad ⁵⁹ lo que ha servido para dividir el CCR en diferentes subtipos.

1.6. SUBTIPOS DE CCR

El CCR puede estratificarse según criterios histológicos o moleculares. Histológicamente, la mayoría de los tumores son carcinomas aunque también podemos encontrar otros subtipos histológicos como neoplasias neuroendocrinas, hamartomas, tumores mesenquimales y linfomas, siendo estos últimos menos frecuentes. De los carcinomas, más del 90% de los tumores son adenocarcinomas. La formación glandular está presente en tumores moderadamente diferenciados y en muy diferenciados. Por el contrario, los adenocarcinomas no diferenciados o pobremente diferenciados (conocidos como tumores de alto grado) no forman estructuras glandulares bien definidas ^{60 28}.

Los tumores que producen altas cantidades de mucina extracelular lo presentan aproximadamente un 11-17% de todos los tumores colorrectales^{61 62 63 64}. Algunos cánceres, particularmente aquellos que se sitúan en el colon distal, contienen áreas con diferenciación escamosa y se denominan carcinomas adenoescamosos⁶⁵. El carcinoma subtipo medular es un tipo de tumor sin formación glandular compuesto por largas células eosinófilas poligonales que crecen en capas sólidas y tienen grandes infiltraciones linfocitarias⁶⁶.

1.6.1. SUBTIPOS MOLECULARES DEL CCR

Los avances en el conocimiento de sus bases moleculares son esenciales para el adecuado manejo del CCR. La anterior clasificación basada en en tres grandes vías: la vía supresora, la vía mutadora y la vía metiladora, permitieron identificar diferentes fenotipos dentro del CCR (Figura 5).

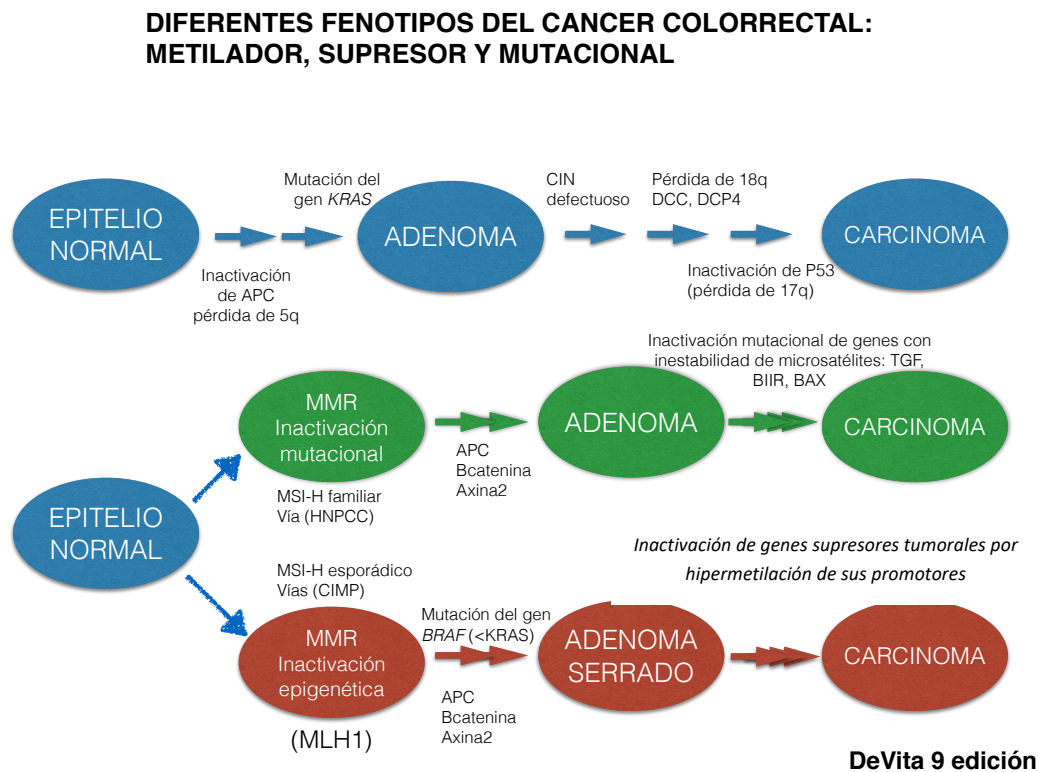


Figura 5. Antigua clasificación molecular del CCR. Imagen modificada del *DeVita* 9 edición.

Actualmente, el “*Colorectal Cancer Subtyping Consortium*” (CCRSC) ha evaluado recientemente los resultados de 6 algoritmos a través de 18 bases de datos procedentes de fuentes públicas y privadas con un total de 4.151 pacientes diagnosticados de CCR en el mundo. De esta manera, se ha establecido la actual clasificación por consenso en 4 subtipos moleculares de CCR “*Colorectal molecular subtypes*” (CMS) (Figura 6)⁶⁷. Los subtipos moleculares actualmente vigentes son los siguientes:

- Subtipo inmune (CMS1): El subtipo 1 representa el 14% de los CCR totales y está caracterizado por alta inestabilidad de microsatélites (MSI), fenotipo hipermetilador “*CpG island methylator phenotype*” (CIMP) y con intensa activación de rutas moleculares de respuesta inmune de evasión tumoral. Además, se ha observado una alta frecuencia de mutaciones en *BRAF* en los tumores de estos pacientes. Histológicamente se ha observado un infiltrado inmune difuso principalmente compuesto por linfocitos T *Helper* tipo 1 y citotóxicos. Clínicamente, es más frecuente en mujeres diagnosticadas de CCR derecho y presentan mayor grado histopatológico con peores datos de supervivencia tras la recidiva ⁶⁷.
- Subtipo canónico (CMS2): El subtipo 2 supone el 37% de todos los pacientes con CCR y presenta una alta expresión de las proteínas implicadas en la ruta molecular WNT/APC/CTNNB1, además de alta expresión de MYC. Las células presentan niveles elevados de inestabilidad cromosómica (CIN) lo que resulta en un alto número de copias somáticas. Los datos histológicos corresponden con mayor diferenciación epitelial. En la práctica clínica los pacientes aparecen con mayor frecuencia asociados a CCR izquierdo y presentan mejor supervivencia tras la recidiva ⁶⁷.
- Subtipo metabólico (CMS3): Este subtipo representa el 13% de los pacientes con CCR y muestra una alta expresión de genes implicados en activar rutas metabólicas intracelulares, como por ejemplo, las mutaciones activadoras del oncogén *KRAS*. Además, presentan niveles intermedios de MSI y baja expresión de fenotipo CIMP y CIN ⁶⁷.
- Subtipo mesenquimal CMS4: El subtipo 4 representa el 23% de los CCR y tiene una alta expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (EMT). Además, presentan alta expresión génica del conocido como “*Transforming Growth Factor β*” (TGFβ), de la remodelación de la matriz extracelular, de procesos de neo-angiogénesis y otros mediadores inflamatorios. Este subgrupo representa a pacientes diagnosticados en estadios más avanzados con peores datos de supervivencia libre de progresión y global respecto a los otros subgrupos ⁶⁷.
- Subtipo mixto: El 13% restante de pacientes correspondería a un subtipo que mostraría perfiles de expresión de patrón mixto entre los anteriormente reseñados. Por consiguiente, desde el punto de vista molecular resultan inclasificables ⁶⁷.

Sin embargo, la aplicabilidad clínica de conocer los diferentes subtipos moleculares para ayudar a decidir el mejor tratamiento y así poder alcanzar lo que se conoce como “tratamiento personalizado” deberá valorarse analizando los datos de respuesta obtenidos en sucesivos ensayos clínicos.

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermethylation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGFβ activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Figura 6. Nueva clasificación molecular propuesta para el CCR que refleja diferencias biológicas significativas en la expresión molecular de los diferentes subtipos. Imagen tomada de Guinney *et al.* Nature 2015 ⁶⁷

1.7. TRATAMIENTO DEL CCR

Un 70% de los pacientes afectados de CCR se diagnostican en estadios localizados. En este grupo de pacientes, la cirugía puede ser curativa aunque el porcentaje de recidivas, tras la intervención inicial es elevado, lo que apoya la necesidad de administración de quimioterapia adyuvante post-cirugía con el objetivo de disminuir el porcentaje de recidivas⁶⁸.

1.7.1. CIRUGÍA

La cirugía es la base fundamental del tratamiento del CCR localizado que incluye los estadios I-III. Su objetivo es la extirpación del tumor primario en bloque con márgenes de seguridad y todo el territorio ganglionar locorregional sin provocar diseminación tumoral. El tratamiento quirúrgico dependerá de la ubicación del tumor primario. Por tanto, la técnica quirúrgica empleada para el carcinoma de colon y de recto es diferente⁶⁹.

El colon es predominantemente intraperitoneal y móvil, lo que facilita su resección con márgenes amplios. Su diseminación es predominantemente a distancia, con preferencia por el hígado. El peritoneo suele afectarse con menos frecuencia lo que se conoce como recurrencia local. Por el contrario, el recto-sigma y recto distal son extraperitoneales y se sitúan en el marco óseo pélvico. Por ello, este tipo de cirugía plantea mayores dificultades técnicas para la resección del tumor con márgenes amplios. Su tendencia es la recidiva local en la pelvis menor y en segundo lugar, las metástasis pulmonares^{69 70}.

Cuando la resección es completa sin evidencia de enfermedad macroscópica en el campo quirúrgico y con márgenes patológicos de la pieza quirúrgica libres del tumor, se denomina R0 y se considera “óptima” en términos oncológicos⁷¹.

1.7.2. TRATAMIENTO ADYUVANTE DEL CCR

El objetivo de la quimioterapia adyuvante consiste en eliminar la enfermedad micrometastásica presente en el momento de la intervención. De esta manera, se aumenta la tasa de curación de estos pacientes. Actualmente está indicada en estadios II y III. El esquema de tratamiento estándar en estos casos es la combinación de 5-fluorouracilo (5FU) con oxaliplatino durante 6 meses⁷². Posteriormente, la combinación de capecitabina y oxaliplatino (XELOX) en combinación de 5FU-Leucovorin en régimen de bolo ha demostrado una ventaja absoluta del 20% en las recidivas y obtuvo una tasa de supervivencia libre de progresión a 3 años de 70.9% *versus* 66.5% (XELOX vs 5FU intravenoso)⁷³.

El tratamiento adyuvante para el CCR metastásico (CCRm) ha evolucionado en los últimos años desde la quimioterapia paliativa como única herramienta terapéutica a una situación actual que contempla la cirugía de metástasis. Para establecer el mejor tratamiento inicial para cada enfermo, la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) clasifica a los pacientes metastásicos en cuatro grupos⁷⁴:

- Grupo 0 (CCRm resecable): se trata de pacientes con metástasis habitualmente únicas, hepáticas o pulmonares, que pueden ser técnicamente resecadas de entrada. En estos casos, se recomienda la cirugía de las metástasis como primera opción⁷⁵.

- Grupo 1 (CCRm potencialmente resecable): se trata de pacientes con metástasis que no son resecables técnicamente, pero que podrían convertirse a resecables tras un tratamiento sistémico previo que se conoce como terapia de conversión. Esta terapia habitualmente incluye dobletes de quimioterapia basados en oxaliplatino o irinotecan con 5FU más terapia biológica asociada (anticuerpos monoclonales anti-EGFR o anti-VEGFR)^{76 77 78}.

- Grupo 2 (CCRm irresecable en pacientes que toleran tratamiento intensivo): se trata de pacientes con múltiples localizaciones metastásicas no susceptibles de cirugía. En estos casos, la resección del tumor primario sólo debe realizarse si existen complicaciones derivadas como obstrucción o sangrado⁷⁹. Aquí se recomiendan esquemas de tratamiento de alta tasa de respuesta en primera línea, habitualmente dobletes o tripletes de quimioterapia basados en oxaliplatino, irinotecan y 5FU, más terapia biológica asociada^{80 81 82 83 84 85}.

- Grupo 3 (CCRm irresecable en pacientes que no toleran tratamiento intensivo): se trata de pacientes con varias localizaciones metastásicas cuyo estado general o condiciones de morbilidad no les hacen candidatos para esquemas de alta eficacia en primera línea. Por lo tanto,

se seleccionarán regímenes de tratamiento para retrasar la progresión del tumor y, en última instancia, aumentar la supervivencia sin alto nivel de toxicidad asociado, por ejemplo monoterapias secuenciales con o sin tratamientos biológicos asociados. En estos casos, se han logrado altas tasas de supervivencia de hasta 20-50% a 5 años e incluso por encima de 10 años⁸⁶
^{87 88}.

El tratamiento para el cáncer de recto es diferente al de colon pues la radioterapia preoperatoria ha demostrado un descenso significativo de la tasa de recidiva local en pacientes operados con extirpación total del mesorrecto respecto a cirugía exclusivamente⁸⁹. Además, la adición de quimioterapia radiosensibilizante basada en capecitabina intravenosa durante radioterapia mejora el control local respecto a la radioterapia *per se*^{90 91}.

1.7.3. TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Los tratamientos biológicos basados en anticuerpos monoclonales se administran sólo en caso de enfermedad metastásica (estadio IV). Existen dos grupos de tratamientos biológicos utilizados en el CCRm. Por una lado, están los fármacos anti-angiogénicos que paralizan y reducen la neovascularización tumoral deteniendo el crecimiento de los tumores dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento vascular-endotelial (anti-VEGFR)⁸⁰. Por otro, los fármacos dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR) que bloquean las rutas de proliferación y la supervivencia celular⁹².

Respecto a los tratamientos anti-angiogénicos, existen distintos tipos de fármacos en función de su mecanismo de acción. Todos ellos bloquean la unión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) a su receptor (VEGFR) o la cascada de señalización intracelular que activa dicha unión. Bevacizumab es el más antiguo aprobado desde el año 2004⁸⁰. Más recientemente se han incorporado Aflibercept⁹³ en el año 2012 y Regorafenib⁹⁴ en el 2015 autorizados según las agencias FDA, EMA y AEMPS. Aquellos pacientes con CCRm y con mutación de *RAS* se les suele pautar fármacos anti-VEGFR⁹⁵.

La determinación de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* se considera factor predictivo de falta de respuesta a terapias anti-EGFR. Las mutaciones de *KRAS* y *NRAS* constituyen un biomarcador de resistencia frente al grupo farmacológico anti-EGFR, por lo que su determinación es obligatoria al diagnóstico de metástasis y el uso de esta terapia queda restringido a pacientes con genotipo nativo⁵¹. Actualmente disponemos de dos fármacos de esta clase, cetuximab⁹² y panitumumab⁹⁶ aprobados respectivamente en 2004 y 2006 por la “U.S. Food&Drug Administration” (FDA), y posteriormente por la “European Medicines Agency” (EMA) y la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

La combinación de un anti-angiogénico y un anti-EGFR asociado a la quimioterapia está actualmente contraindicada por haber demostrado efectos deletéreos en supervivencia en dos ensayos clínicos aleatorizados^{97 98}.

Además de su respuesta de bloqueo anti-EGFR, el cetuximab es un fármaco que al ser un anticuerpo monoclonal tipo IgG1 le confiere la propiedad de ejercer respuesta citotóxica celular mediada por anticuerpo (ADCC)⁹⁹. Esta propiedad es muy importante, ya que dota a esta molécula de la capacidad de matar células tumorales independientemente de cualquier mutación activadora de *KRAS* o *BRAF*.

1.8. CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO (ADCC)

El infiltrado de células inmunitarias en tumores se asocia con un efecto pronóstico favorable^{100 101 102}. En el CRC, se ha demostrado que el tiempo a la recurrencia y la supervivencia global se correlacionan con la potencia que tiene el paciente en cuanto a la reacción inmune adaptativa^{100 103} en el tumor de colon y en los márgenes invasivos¹⁰⁴. Además, existen varios ensayos clínicos que combinan las terapias anti-EGFR con la activación del ADCC de manera satisfactoria aumentando la supervivencia de los pacientes con distintos tipos de tumores¹⁰⁵.

Otra forma de matar las células tumorales directamente es a través de la respuesta ADCC, en la cual, las células NK expresan el receptor FcγRIII (CD16), lo que les permite destruir células alteradas por distintos agentes. Las citoquinas: IL-2, IL-12, IL-18 y IL-15 estimulan aún más la actividad de las células NK mientras que otras inducen la producción de interferón-gamma (INF-γ). Estas células NK también participan indirectamente en el proceso de destrucción celular. Actuando como células reguladoras, las células NK interactúan con células dendríticas, macrófagos, células T y células endoteliales a través de la producción de varias citoquinas tales como INF-γ, TNF-α e IL-10, así como otras quimioquinas y factores de crecimiento. Al liberar INF-γ, estas células inducen a las células citotóxicas CD8+ a diferenciarse en linfocitos T citotóxicos (CTL). También ayudan en la diferenciación de CTL mediante la inducción de células CD4+. Además, en el curso de la destrucción de las células tumorales por las células NK, los antígenos producidos, son absorbidos por las células presentadoras de antígenos (APC) para la inducción de la respuesta inmune adaptativa¹⁰⁶.

Entre otras poblaciones celulares, las células NK juegan un papel esencial en esta respuesta, tanto por la interacción con el propio tumor como por ciertos fármacos anti-EGFR IgG1.

1.8.1 CÉLULAS ASESINAS NATURALES (NK)

El término "asesino natural" de estas células NK es relevante en el sentido de que no requieren activación previa para matar células que carecen del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I¹⁰⁷ (Figura 7A). Esta propiedad de las células NK las hace eficientes en la detección y destrucción de células infectadas o anormales que carecen de MHCs, y que de otro modo, podrían escapar a la detección por parte de las células inmunes como los linfocitos T¹⁰⁸. Recientemente, se ha reconocido que las células NK juegan un papel importante en la inmunosupresión tumoral, es decir, causan la muerte directa de las células tumorales sin la presencia de moléculas de adhesión superficial o péptidos antigénicos¹⁰⁹ (Figura 7B). Esto conduce a la activación de células NK y posterior producción y liberación de citoquinas y enzimas líticas como la perforina, granzima, FasL y óxido nítrico¹¹⁰ (Figura 7B).

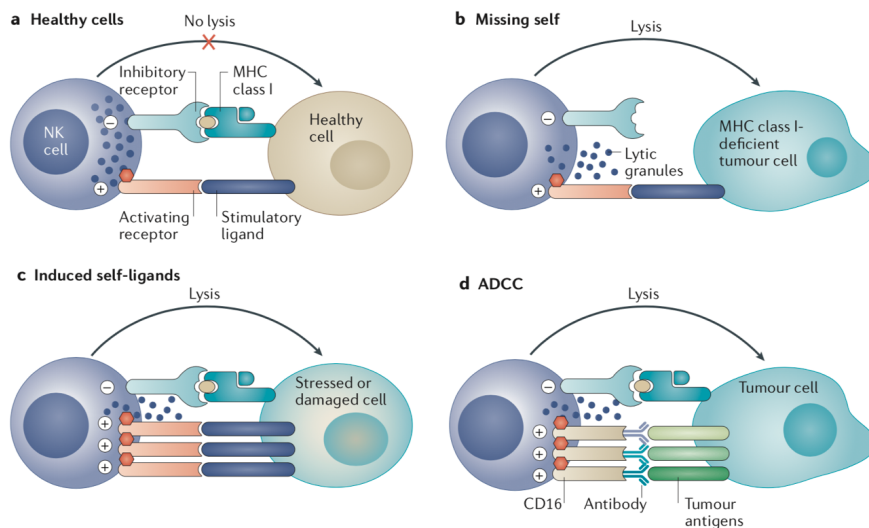


Figura 7. Representación esquemática de las funciones de las células NK. Imagen tomada de Nature Reviews¹¹¹.

Al proporcionar ligandos exógenos inducidos por estrés del receptor tipo "Toll-like Receptors" (TLR) se puede fortalecer la producción de citoquinas (Figura 7C). Finalmente, el receptor FcγRIII (CD16) desencadena la respuesta mediada por la ADCC en células NK a través del reconocimiento de la fracción constante (Fc) de los anticuerpos¹¹² (Figura 7D). Este mecanismo desempeña un papel en respuesta a la infección viral, la autoinmunidad y en la protección contra algunas formas de tumores^{113 114 115}. Por lo tanto, la ADCC mediada por células NK a través de la utilización de anticuerpos monoclonales (mAb) IgG1 específicos es una herramienta terapéutica muy efectiva^{116 117 118 119 120}.

1.8.2. RECEPTORES FcγRIIa Y FcγRIIIa

Los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas IIa o IIIa (FcγRIIa y FcγRIIIa, respectivamente) juegan un papel muy importante en la activación de la respuesta ADCC cuando un anticuerpo IgG1 interacciona con ellos. Cuando ambos se unen, activan a las células inmunes efectoras, que pueden ser células NK, linfocitos y macrófagos ¹²¹.

Se han descrito polimorfismos específicos en los genes *FcγR*, con mayor interacción con terapias basadas en anticuerpos monoclonales IgG1 como es el caso del cetuximab, lo que activa la respuesta ADCC más intensa y una mejor evolución de los pacientes en varios tipos de cáncer ¹²² ¹²³. Concretamente, la presencia de al menos una histidina en la posición 131 en *FcγRIIIa* en vez de arginina (*FcγRIIIa-131H/R*) ha mostrado una mayor capacidad para controlar la enfermedad en pacientes con CCRm con *KRAS* mutado ⁹⁹ (Figura 8).

En relación con el receptor FcγRIIIa y la inducción de respuesta ADCC en pacientes con CCRm encontramos controversia en distintos autores. En un estudio no se encontró significación estadística relativa a la supervivencia global y a la progresión libre de enfermedad en relación con FcγRIIIa en pacientes con estado mutacional en *KRAS* ¹²⁴. Mientras que en otro estudio sí que encontraron una tendencia a la significación en el ratio de control de enfermedad en aquellos pacientes que poseían un polimorfismo en la secuencia génica del *FcγRIIIa*. Especialmente en aquellos que poseían una valina en la posición 158 en vez de fenilalanina (*FcγRIIIa-158V/F*) ($P=0.08$) ⁹⁹. Además, cuando los polimorfismos en *FcγRIIa* y *FcγRIIIa* se combinaron, sí que se encontró un alto ratio de control de enfermedad en los pacientes (65% versus 35%, $P=0.014$) ⁹⁹ (Figura 8).

Recientemente, otro estudio diferente ha demostrado que el genotipo *FcγRIIIa-158V/V* está correlacionado con una mayor respuesta ADCC que aquellos que poseen el genotipo *FcγRIIIa-158V/F* o *FcγRIIIa-158F/F* ($P=0.04$) ¹²⁵. Aunque este estudio hay que tomarlo con cautela, ya que el tamaño muestral es muy limitado para confirmar esta asociación.

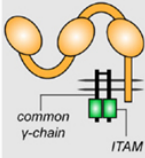
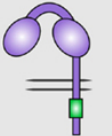
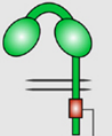

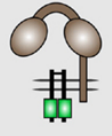
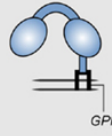
Name	FcγRI CD64	FcγRIIa CD32a	FcγRIIb C32b	FcγRIIc CD32c	FcγRIIIa CD16a	FcγRIIIb CD16b
Structure						
Function	Activating	Activating	Inhibitory	Activating	Activating	Activating
Affinity	High	Low	Low	Low	Low	Low
SNP		131H/R R: reduced affinity to IgG2	232I/T T: decreased inhibitory activity	57Q/X X: stop codon (non-functional protein)	158F/V V: increased affinity to IgG1/3/4	NA1/2 NA2: reduced affinity to IgG1/3

Figura 8. Familia de receptores FcγRs. El único receptor inhibidor es el FcγRIIb, mientras que los otros receptores son activadores. Ciertos SNP descritos afectan a la afinidad frente a las inmunoglobulinas IgG1. Imagen tomada de Vogelpoel *et al.* 2015¹²⁶.

1.8.3. RECEPTORES KIR

Las células NK expresan además una serie de receptores activadores e inhibidores de su función efectora. Estos receptores se les conoce como “*killer immunoglobulin receptor*” (KIR), y transmiten señales inhibitoras o activadoras tras el reconocimiento de los ligandos “*human leukocyte antigen*” (HLA) clase I en la superficie de las células diana¹²⁷.

Los genes *KIR* se descubrieron mediante hibridación sustractiva en 1995^{128 129}. Desde entonces, quince genes *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2/L3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1/S1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*), y dos pseudogenes (*KIR2DP1* y *KIR3DP1*) se han identificado dentro del locus *KIR* en el cromosoma 19. Los receptores KIR reciben su nombre según contengan 2 o 3 dominios similares a las inmunoglobulinas (Ig) (de ahí KIR2D o KIR3D); así como colas citoplasmáticas cortas (S) o largas (L) que se representan como KIR2DS o KIR2DL, respectivamente. Los receptores KIR varían en longitud de 306 a 456 aminoácidos dependiendo de la cantidad de dominios que contengan.

Los receptores KIR inhibidores tienen colas citoplasmáticas largas que contienen motivos conocidos como “*immunoreceptor tyrosine-base inhibition motif*” (ITIM), que tras su reconocimiento, se inhibe la activación de células NK¹³⁰ (Figura 9, en rojo). Los KIR activadores tienen colas citoplasmáticas cortas que se asocian de forma no covalente con el adaptador de señalización DAP12 que contiene un motivo de activación conocido como “*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*” (ITAM)¹³¹ (Figura 9, en verde). La excepción a esto es el receptor KIR2DL4 que posee un residuo de arginina cargado en su dominio transmembrana que le permite generar señales inhibitoras y activadoras al mismo tiempo¹³² (Figura 9).

Cada individuo difiere en el número de genes *KIR* que están contenidos dentro de su genoma, generando haplotipos¹³³. Aunque además de la diversidad genética, la expresión de los genes *KIR* es estocástica, y las células NK expresan diferentes tipos de genes *KIR* de forma aleatoria dependiendo del estado de metilación de su promotor^{134 135}.

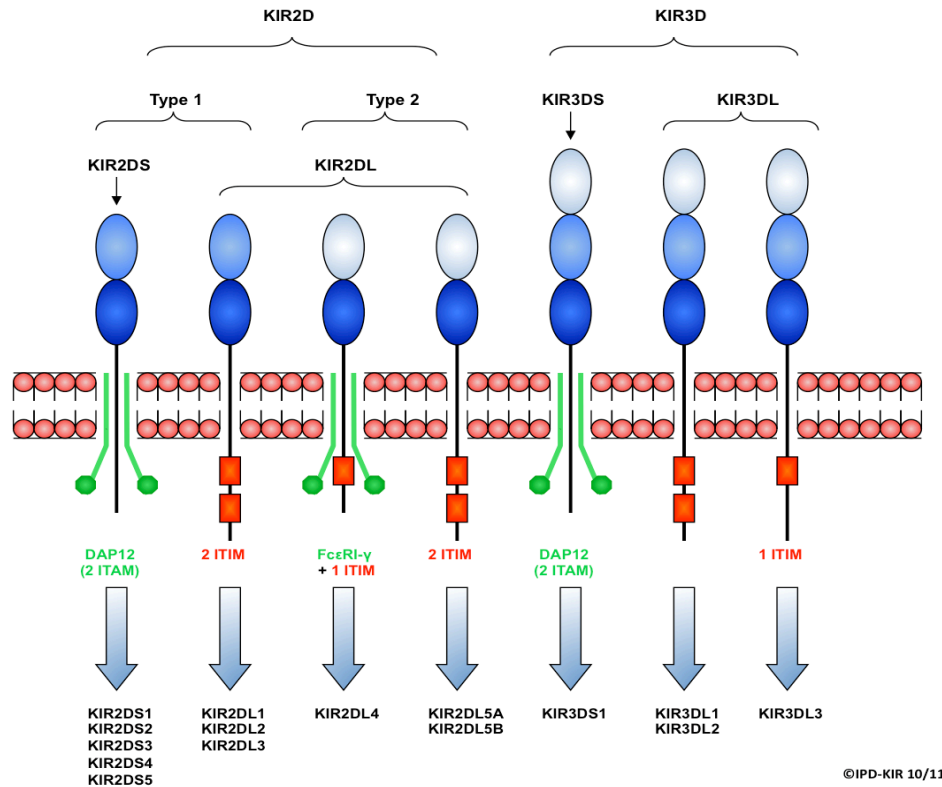


Figura 9: Tipos de receptores KIR. La asociación entre las colas adaptadoras y los receptores KIR activadores están marcados en verde, mientras que los dominios ITIM de los KIR inhibidores se muestran en cajas rojas. Imagen tomada de la *Immuno-polymorphism data base* del *European Bioinformatic Institut* (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>).

Descubrimientos recientes han demostrado que los polimorfismos puntuales en los genes que codifican para los receptores de membrana KIR conducen a su retención citoplasmática o a la formación de variantes solubles, como es el caso de la variante delecionada *KIR2DS4del*. Los receptores con variante delecionada, *KIR2DS4del*, no se expresan en la superficie de la membrana celular de las NK debido a la interrupción de su secuencia de proteína debido a una deleción de 22 pares de bases en el exón 5^{136 137}. La ausencia de un dominio transmembrana y citoplasmático junto con la alta frecuencia de este alelo en poblaciones humanas ha sugerido la posibilidad de que estas variantes proteicas truncadas puedan ser secretadas por las células NK^{137 132}.

A nivel clínico la variante delecionada que más se ha estudiado es la variante *KIR2DS4del* que se ha asociado a una mayor respuesta molecular frente a tratamientos basados en inhibidores de tirosina quinasa (TKI) en pacientes con leucemia mieloide crónica ($P < 0.001$), lo que indica una actividad inmune potente de las células NK¹³⁸. Por otra parte, la variante completa, *KIR2DS4full*, se ha asociado con la patogénesis del VIH¹³⁹, y a una peor respuesta a fármacos en artritis reumatoide¹⁴⁰. Sin embargo, poco se sabe de las funciones de estas variantes en tumores sólidos y ni de su relación con la ADCC de las células NK.

2. HIPÓTESIS

Desde que se conoce que hay un 14% de pacientes con CCRm y mutación de *KRAS* que responden al tratamiento basado en anticuerpos monoclonales anti-EGFR, cetuximab; nuestra hipótesis es que ciertas variantes génicas que codifican para los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas: FcγRIIa, FcγRIIIa; y otras variantes génicas que codifican para los receptores KIR de las células NK, pueden determinar una mayor tasa de respuesta al cetuximab a través de la activación de la ADCC.

3. OBJETIVOS

Para demostrar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Reclutar muestras de tumores sólidos y de sangre periférica de pacientes de CCRm con *KRAS* mutado tras la cirugía que iban a ser tratados en adyuvancia con cetuximab.
2. Determinar en los bloques tumorales de los pacientes la expresión de EGFR y la expresión del polimorfismo *FcγRIIa-131H/H* previamente descrito como favorable.
3. Seleccionar las muestras de pacientes positivas para las tres alteraciones (expresión de EGFR, mutación de *KRAS* y polimorfismo en *FcγRIIa-131H/H*) y estudiar el pronóstico de los pacientes en función de las características clínico-patológicas.
4. Evaluar las variantes en los genes que codifican para los receptores FcγRIIIa y KIR.
5. Estudiar la supervivencia global (objetivo principal), y la supervivencia libre de progresión (objetivo secundario) de los pacientes seleccionados en función de las variantes en los genes *FcγRIIIa* y *KIR*.
6. Diseñar un modelo *in vitro* para cuantificar la ADCC en función de las variantes génicas de *FcγRIIIa* y *KIR* para la validación de los resultados encontrados en la serie clínica.
7. Proponer una firma molecular que prediga una mayor respuesta a cetuximab basada en la activación de la ADCC por aquellas variantes génicas favorables en los receptores de superficie *FcγRIIa*, *FcγRIIIa* y/o *KIR*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MUESTRAS DE PACIENTES

4.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y RECLUTAMIENTO DE LOS PACIENTES

Los pacientes reclutados provenían de hospitales localizados por toda España (Tabla 6). Todos los pacientes fueron informados convenientemente y se le entregó la hoja de información al paciente. Asimismo, los pacientes firmaron el documento de consentimiento informado de cesión de muestras para investigación previamente a su reclutamiento.

Los criterios clínico-patológicos para la inclusión de este estudio fueron los siguientes: los pacientes tenían que tener una confirmación histológica de CCRm con *KRAS* mutado y ser refractarios a la segunda línea de tratamiento. Ser mayores de edad. Además, debían presentar buen estado general con valor de ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) entre 0-2 y tener adecuadas funciones renales, medulares y hepáticas. Los criterios de exclusión fueron: pacientes que presentasen metástasis cerebrales. Pacientes tratados con una terapia previa con anticuerpos monoclonales anti-EGFR o que hubiesen presentado toxicidad por quimioterapia previa mayor a grado 1.

En cuanto a los criterios moleculares (los determinados en el laboratorio central), todos los pacientes debían cumplir:

- Presentar en el gen que codifica para el receptor FcγRIIIa al menos una histidina (Hys) en la posición 131, siendo aptos aquellos homocigotos (Hys-Hys) o heterocigotos (Hys-Arg).
- Expresión positiva del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la pieza tumoral primaria y/o metastásica.

Tabla 6: Centros hospitalarios participantes del estudio clínico y número de pacientes reclutados por cada centro.

Centro	N (%)
Clínica Univ. de Navarra (CUN)	2 (2.86)
Fundación Jiménez Díaz	3 (4.29)
Hospital Clínica Universitaria Santiago de Compostela	4 (5.71)
Hospital Clinic i Provincial de Barcelona	3 (4.29)
Hospital Clínico Univ. (de Valencia)	3 (4.11)

Hospital Gregorio Marañón	10 (14.29)
Hospital Juan Canalejo (CHUAC)	3 (4.29)
Hospital Ramón y Cajal	1 (1.43)
Hospital Reina Sofía (de Córdoba)	7 (10.00)
Hospital Univ. Central de Asturias	2 (2.86)
Hospital Vall d'Hebron	7 (10.00)
Hospital Virgen del Rocío	24 (34.29)
Hospital de Navarra	1 (1.43)
Total	70

4.1.2 CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Dado que nuestra población es finita, es decir conocemos el total de la población y para saber cuántos individuos del total tendremos que estudiar la fórmula a seguir sería:

$$n = \frac{N \times Z_{\alpha}^2 \times p \times q}{d^2 \times (N-1) + N \times Z_{\alpha}^2 \times p \times q}$$

Donde:

N = Total de la población

$Z_{\alpha}^2 = 1.962$ (si la seguridad es del 95%)

p = proporción esperada (en este caso 5% = 0.05)

q = 1 – p (en este caso 1-0.05 = 0.95)

d = precisión (en este caso un 5%).

Dado que la incidencia de cáncer colorrectal en España es de 32240 pacientes, aproximadamente un 20% de ellos tienen enfermedad metastásica al diagnóstico (6448 pacientes) y aproximadamente un 40% de estos pacientes con cáncer colorrectal metastásico tienen mutación en el gen *KRAS*, nuestra población de partida será de 2579 pacientes.

Aplicando nuestra fórmula:

$$n = \frac{2579 \times (1.96)^2 \times 0.05 \times 0.95}{0.05^2 \times (2579-1) + 2579 \times (1.96)^2 \times 0.05 \times 0.95} = 71 \text{ pacientes}$$

4.1.3 EXTRACCION DE ADN TUMORAL A PARTIR DEL BLOQUE DE PARAFINA

Para la extracción de ADN tumoral se utilizaron 3 cortes de 10µm del tumor fijado en formol y embebido en parafina de cada paciente. En aquellas muestras que presentaban tanto tejido sano como tumoral se realizó macrodissección en cada corte y, en el caso de que el tejido tumoral representase menos del 50% de la muestra se tomaron dos cortes más. Posteriormente, utilizamos el kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen), y seguimos el protocolo indicado por el fabricante. El protocolo se basa en desparafinar la muestra utilizando incubaciones sucesivas de xilol seguidos de lavados con alcohol al 96% y rehidratar el tejido finalmente con alcohol al 70%. Posteriormente, con los tampones específicos del kit se llevó a cabo la lisis de las células y digestión con diferentes enzimas como la proteinasa K y ARNasa A para la degradación y eliminación de las proteínas y el ARN presentes en cada muestra. Finalmente, se les añadió etanol al 70% para precipitar el ADN e hicimos pasar la muestra por una columna de afinidad específica para ADN. A continuación, se realizan distintos lavados con soluciones tamponadas específicas del kit para finalmente eluir el ADN presente en la columna utilizando agua bidestilada, desionizada y ultrapura. La cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante espectrofotometría con el equipo NanoDrop 3.0.0 (Nucliber).

4.1.4 DETERMINACION DE MUTACIONES EN EL GEN KRAS

La determinación de mutaciones del gen *KRAS* se determinó a partir de ADN extraído de células tumorales procedentes del bloque de tumor fijado en formol y embebido en parafina. Se utilizaron 100 ng/µl de ADN tumoral de cada paciente para el análisis de mutaciones en el gen *KRAS* utilizando el kit Therascreen® *KRAS* RGQ PCR (Qiagen) siguiendo las instrucciones del mismo y usando la plataforma Rotor-Gene Q (Qiagen) (Figura 10). Esta técnica consiste en una retrotranscripción seguida de una PCR (RT-PCR) en la que se amplifican las mutaciones más frecuentes en el gen *KRAS*: G12A, G12D, G12R, G12C, G12V, G12S, G13D Y G13D. A diferencia de las PCR en tiempo real actuales, esta determinación se lleva a cabo en un termociclador especial que combina la medición de la amplificación y la rotación centrífuga de las muestras al mismo tiempo. Cada tubo es sometido a una fuerza centrífuga en una cámara de aire manteniéndolos a todos exactamente a la misma temperatura durante cada ciclo. Cuando cada tubo se alinea con el detector óptico, la muestra se ilumina y la señal fluorescente que emite es registrada rápidamente a través de un canal óptico. Los resultados fueron analizados con el

software 2.3 del Rotor-Gene Q (Qiagen), de manera que si el paciente presenta más de una mutación la muestra se informó como positiva para la mutación predominante.

Cada resultado fue añadido a la base de datos para su integración en el registro y posterior análisis.



Figura 10. a) Imagen de la preparación de las muestras para el Rotor-Gene Q. b y c) imagen del Rotor-Gene Q.

4.1.5 EXTRACCIÓN DEL ADN SOMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS *FcγRIIa-H131R* y *FcγRIIIa-V158F*

Se recogieron 5 ml de sangre periférica de cada paciente o donante sano en tubos con EDTA (Vacutainer, BD). Para la extracción de ADN germinal se utilizaron 400 μ l de la sangre de cada individuo y se procesaron mediante el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) siguiendo los pasos indicados por el fabricante del kit. Básicamente, los pasos a seguir fueron la lisis de la muestra con soluciones tamponadas específicas del kit. Posteriormente, se incubaron con proteinasa K y ARNasa A para digerir las proteínas y el ARN presentes en la muestra. Después, el producto de lisis se hizo pasar por la columna de afinidad para ADN. Tras realizar varios lavados, finalmente eluimos el DNA utilizando agua bidestilada, desionizada y ultrapura. La cuantificación del DNA se llevó a cabo utilizando el NanoDrop 3.0.0 (Nucliber).

4.1.6 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS *FcγRIIa-H131R* y *FcγRIIIa-V158F*.

Los polimorfismos en *FcγRIIa-H131R* y en *FcγRIIIa-V158F* se determinaron mediante PCR cuantitativa usando sondas TaqMan (Life Technologies) para la discriminación alélica del polimorfismo (código de ensayo: C_9077561_20 para H131R en *FcγRIIa*; C_25815666_10 para V158F en *FcγRIIIa*, (Life Technologies)) (Figura 11). El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. Tomamos 40 ng de DNA y 6.25 μ l de Taqman Universal PCR Master Mix en un volumen de reacción total de 12 μ l. La discriminación alélica se realizó con la

7500 Fast Real time PCR system (Life Technologies). Durante el proceso añadimos los controles endógenos correspondientes para asegurar la validez de nuestra PCR. Los resultados fueron analizados con el *Software* v2.0.6. Ink. En el caso del polimorfismo *FcγRIIIa*, al ser un marcador necesario para el reclutamiento del paciente, llamamos polimorfismo favorable a aquellos pacientes que presentaron al menos una Histidina (Hys) en la posición 131. Es decir, solamente fueron favorables aquellos pacientes homocigotos para Histidina (Hys-Hys) o heterocigotos (Hys-Arg).

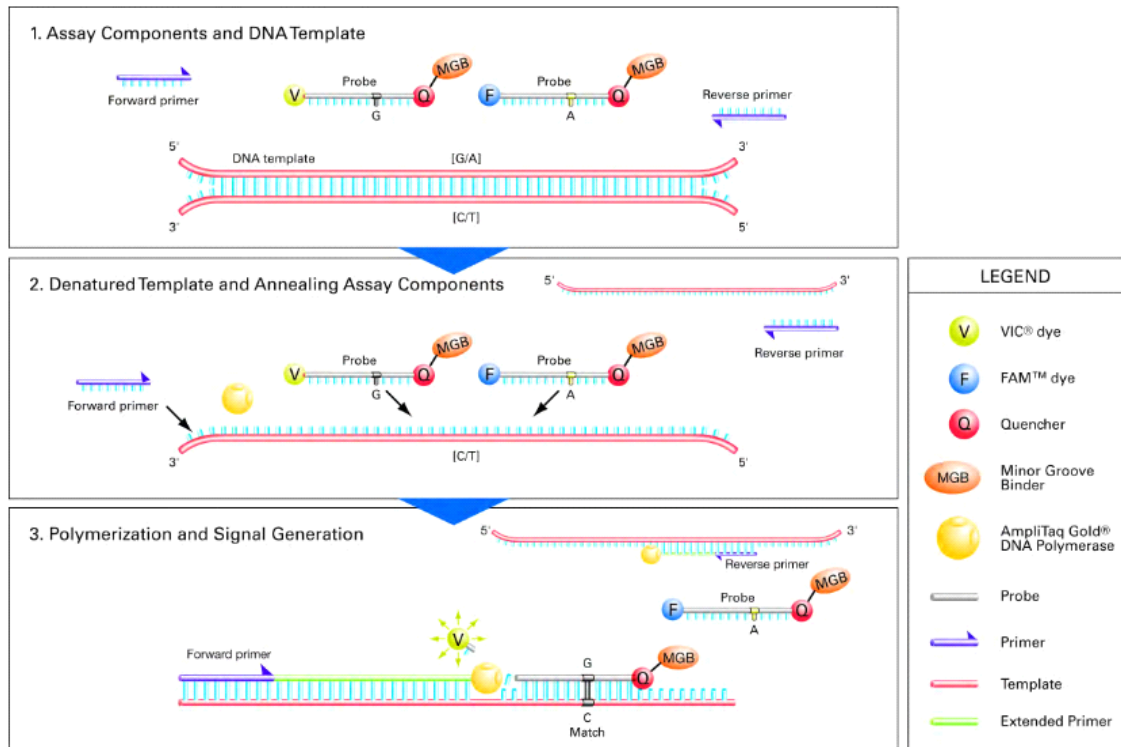


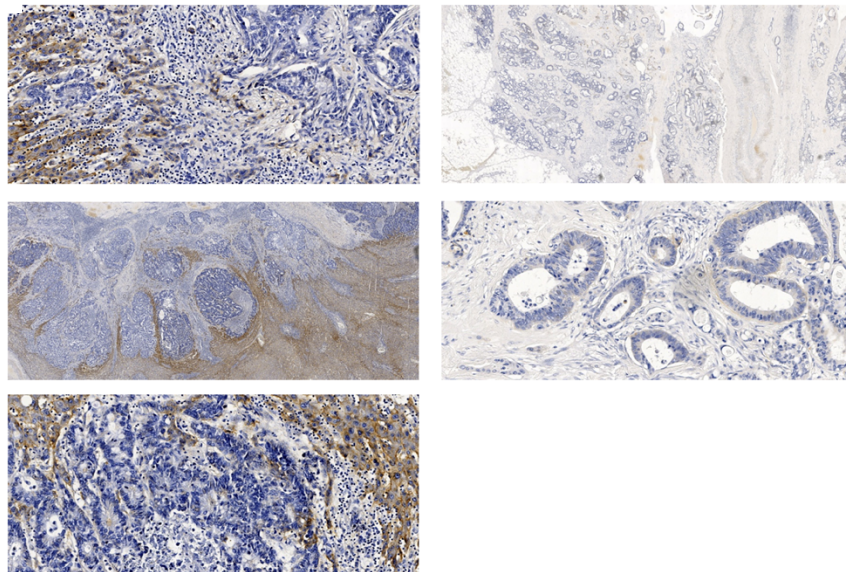
Figura 11. Esquema explicativo de la unión de las sondas Vic y Fam para los polimorfismos de los genes *FcγRIIIa* y *FcγRIIIa*. Imagen tomada de las instrucciones del propio kit.

4.1.7 DETERMINACIÓN DEL EGFR EN EL BLOQUE TUMORAL

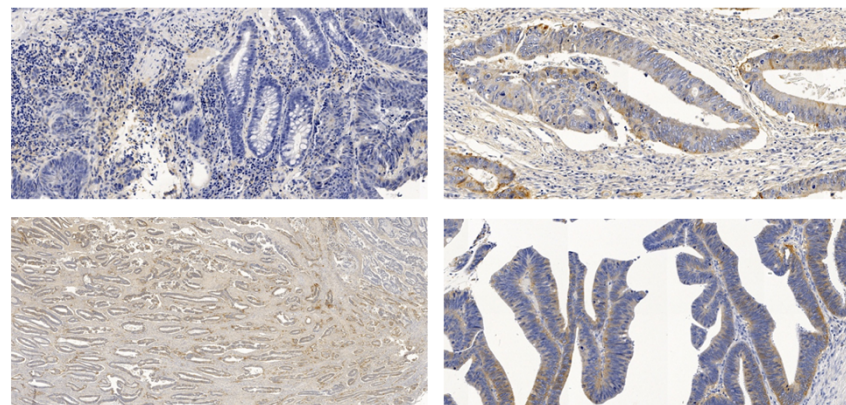
La expresión de EGFR se determinó en el bloque tumoral fijado en formol y embebido en parafina de cada paciente (del tumor primario o de la metástasis) mediante inmunohistoquímica. Para dicha determinación se usó ensayo cerrado de EGFR pharmDx™ (Dako, Agilent) para la plataforma Dako Autostainer (Dako, Agilent), y la inmunotinción se realizó de forma automatizada mediante el Autostainerlink 48 (Dako, Agilent). Esta técnica inmunohistoquímica se basa en la inmunoreacción entre antígeno/anticuerpo. Consta de un pre-tratamiento con proteinasa K y bloqueo de la peroxidasa endógena. Posteriormente, se le añadió el anticuerpo primario anti-EGFR y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Finalmente, se le añadió el cromógeno (diaminobencidina) y la contratinción se realizó con hematoxilina. Cabe destacar que este anticuerpo usualmente tiñe el citoplasma y espacios intersticiales que no han de confundirse

con la expresión en membrana celular que es donde realmente ha de evaluarse la positividad del EGFR. Las tinciones fueron evaluadas por dos patólogos cualificados, alcanzándose un 85% de concordancia en las evaluaciones. Los casos discordantes se valoraron de forma conjunta utilizando un microscopio multicabezal. Para la evaluación de EGFR, las IHQ se utilizó tanto la intensidad: negativa (0) o positiva (1, 2 y 3); así como el porcentaje de células tumorales que expresaba el EGFR. En nuestro caso era necesario que las muestras de los pacientes tuvieran un mínimo de expresión de EGFR que justificara su tratamiento con cetuximab (anti-EGFR). Por ello, el punto de corte fue expresión de EGFR mayor al 10% con una intensidad mínima de 1 (Figura 12).

a EGFR-



b EGFR+



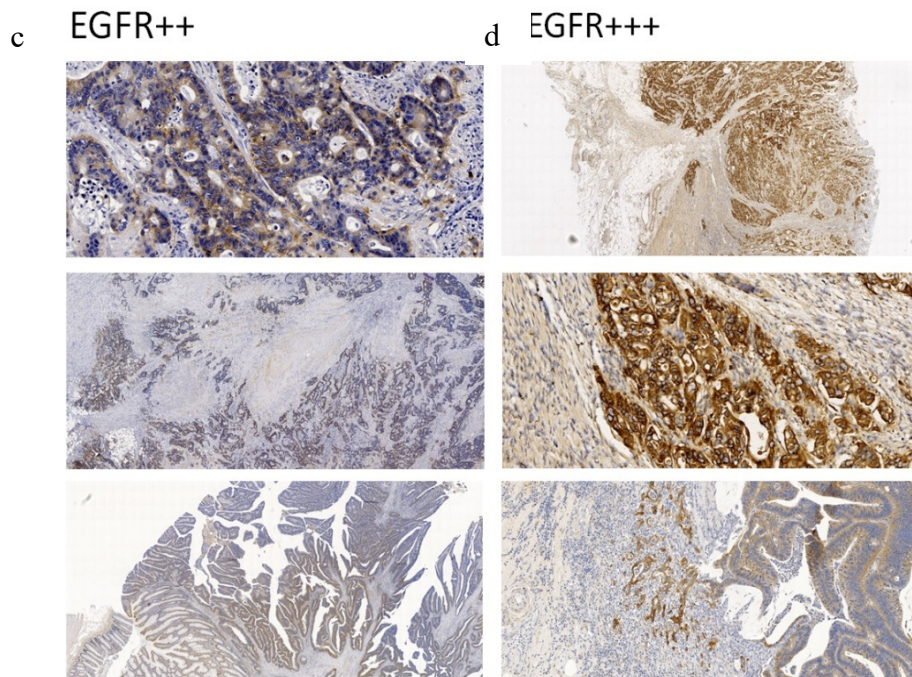


Figura 12. Expresión de EGFR en los bloques tumorales parafinados de pacientes. Expresión negativa (a), positiva+ (b), positiva++ (c) positiva+++ (d) del EGFR en los distintos bloques tumorales representativos de los pacientes incluidos en el estudio. Las imágenes fueron tomadas a 10X y 40X.

4.1.8 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *KIR* DE LAS CÉLULAS NK (*NATURAL KILLER*)

La determinación de los genes que codifican para los receptores KIR de las células NK se llevó a cabo con el ADN somático de cada paciente utilizando el kit KIR Genotyping SSP Kit (Invitrogen).

Mediante 21 reacciones de PCR fue posible determinar la presencia o ausencia de los siguientes genes: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4f*, *KIR2DS4d*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1*, *KIR3DP1f* y *KIR3DP1d*. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en placas previamente cargadas con cebadores específicos para cada gen. A este preparado añadimos una solución tampón específica, agua bidestilada/desionizada/ultrapura y la enzima Taq polimerasa. El kit incluía controles positivos para confirmar una correcta amplificación (se pueden apreciar en el gel de agarosa con bandas de 200 y 800 pares de bases dependiendo de la reacción (Figura 13). Como control negativo se utilizó la misma mezcla de reactivos sustituyendo el ADN por agua bidestilada/ultrapura. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies).

Todos los productos de amplificación se cargaron y se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El gel se tiñó con SYBR Safe (Thermo Fisher) y el resultado se adquirió con el GelPrinter Plus. Para la interpretación seguimos las instrucciones del propio kit.

Los resultados se registraron y guardaron en la base de datos para su posterior análisis estadístico.

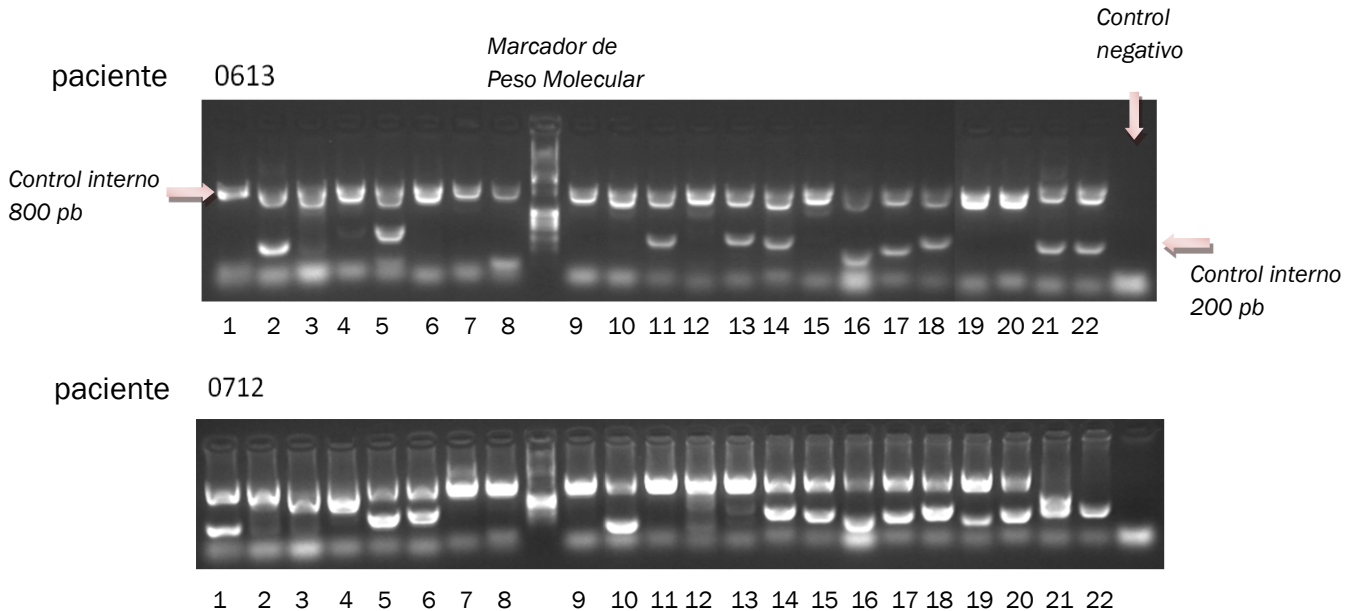


Figura 13. a) y b) Geles de electroforesis de los genes *KIR*. Corresponden a geles de electroforesis seleccionados de dos pacientes independientes incluidos en el ensayo (pacientes 0613 y 0712) en los que podemos observar los distintos genes *KIR*. Las flechas señalan los distintos controles introducidos dentro de la técnica. El carril situado entre el 8 y 9 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles numerados del 1 al 22 corresponden a la carga del ADN del paciente con las distintas sondas para cada polimorfismo *KIR*.

4.2 ESTUDIOS *IN VITRO* PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO (ADCC)

Con el objetivo de confirmar los resultados observados en la serie de pacientes se realizaron una serie de experimentos *in vitro* utilizando la línea celular de cáncer colorrectal LS147T (previamente adquirida de la *American Type Culture Collection* (ATCC), con mutación G12D en el gen *KRAS*). Para ello, la co-cultivamos con linfocitos de donantes que presentaban la versión delecionada del gen (*KIR2DS4d*) o portadores del genotipo heterocigoto *KIR2DS4d* o *KIR2DS4fd* en presencia de cetuximab. Los primeros no tendrían un receptor funcional (RNF), mientras que los segundos sí (Figura 14).

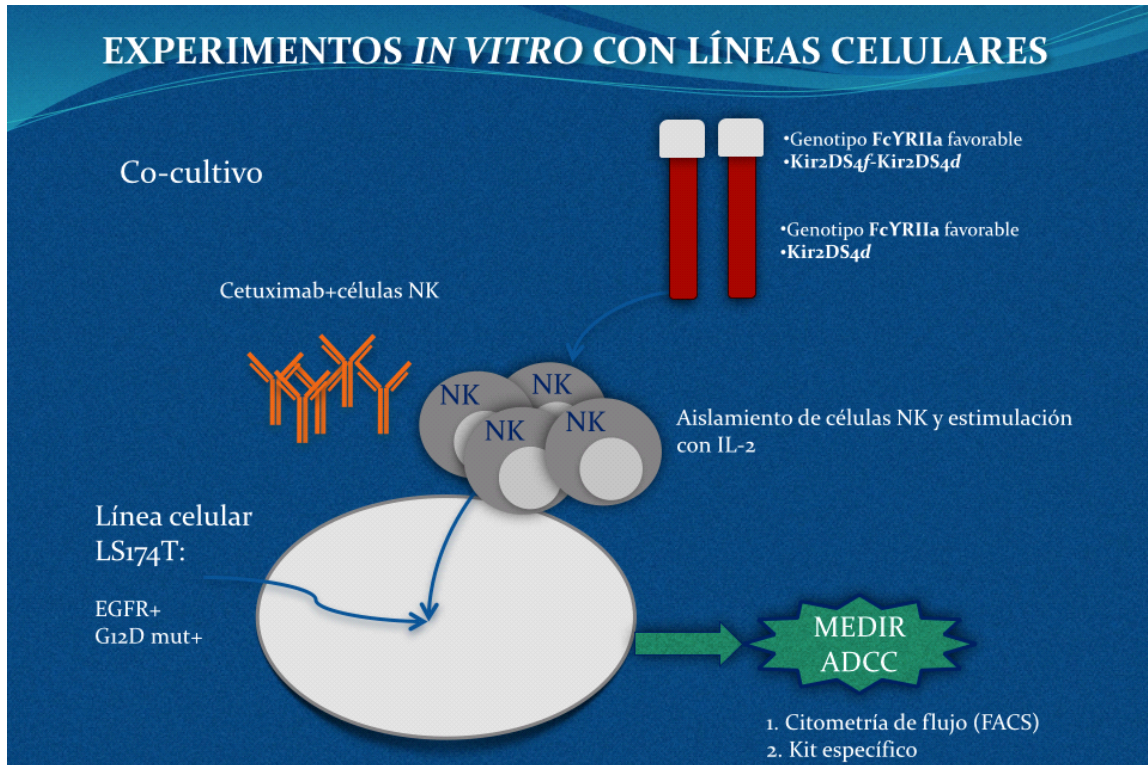


Figura 14. Imagen esquemática de los experimentos *in vitro* para la determinación de la ADCC.

4.2.1 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN *FcγRIIIa*, *KIR2DS4f*, *KIR2DS4f* y *KIR2DS4d*

Se realizó un cribado de donantes de sangre sanos para identificar aquellos portadores de los genotipos de interés.

La determinación del polimorfismo *FcγRIIIa-H131R* se realizó de la misma manera que en la serie de pacientes (apartado 1.2).

En cuanto a la determinación del gen *KIR2DS4*, se llevó a cabo una reacción de amplificación en cadena por polimerasa (PCR) del ADN en el termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies) (Figura 15). Posteriormente se visualizó el resultado mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2%. Esta determinación incluye tanto controles positivos como negativos para la correcta interpretación de los resultados. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron obtenidas de publicaciones previas y se muestran a continuación^{141 142}:

KIR2DS4fw: 5'GGTTCAGGCAGGAGAGAAT3';

KIR2DS4rv: 5'CTGGAATGTTCCGTKGATG3';

Control interno_fw: 5'GAGGTAACGTGCTCACGAACAGC3' y

Control interno_rv: 5'GGTCCATACCCAGTGCTTGAGAAG3'.

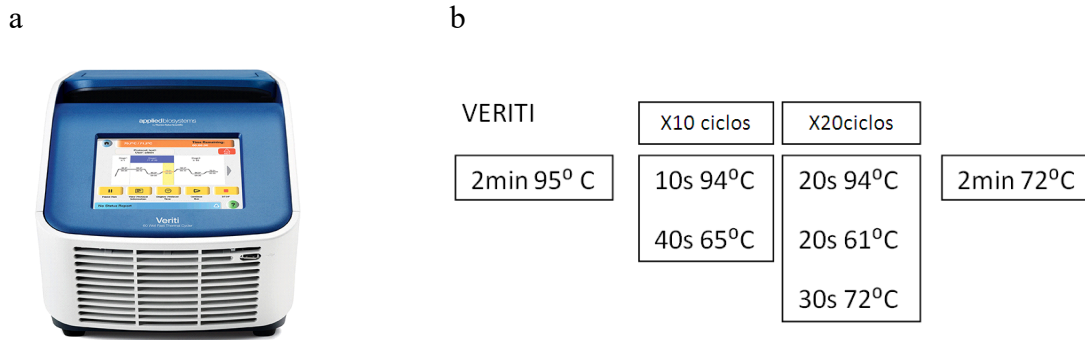


Figura 15. a) Imagen del equipo termociclador utilizado; b) Condiciones aplicadas en la PCR.

4.2.2 CULTIVO CELULAR

La línea celular de CCR seleccionada fue LS147T (Figura 16) (*KRAS* mutada G12D y EGFR+ positivo). Se cultivó en medio DMEM con glutamina y suplementado de suero de ternera fetal (STF) al 10% y con penicilina/estreptomicina (P/S) al 1%. Las células se mantuvieron en un incubador de CO₂ al 5% y 37°C en atmósfera húmeda.

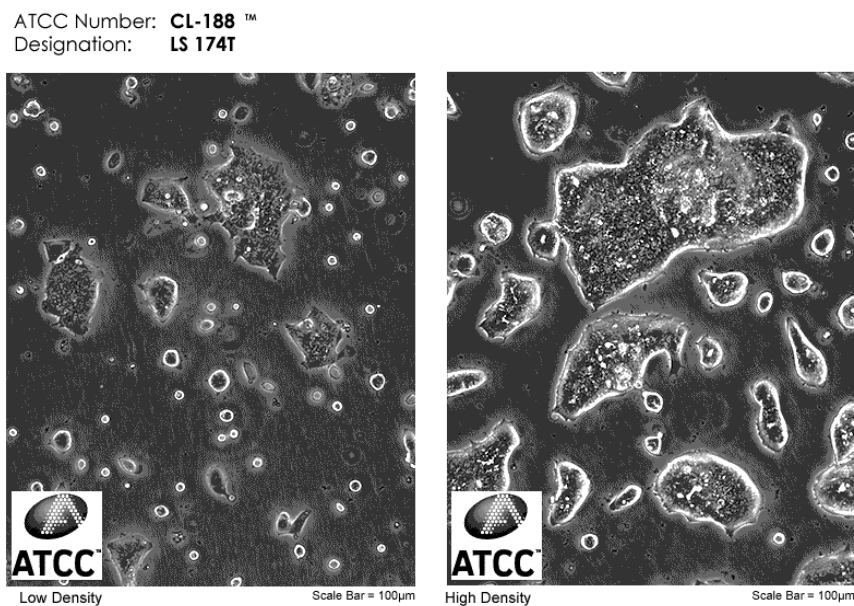


Figura 16. Imagen de las células LS147T a distinto grado de confluencia. Imagen tomada de la propia página web de la ATCC.

4.2.3 AISLAMIENTO DE POBLACIONES LINFOCITARIAS MEDIANTE GRADIENTE DE DENSIDAD

La extracción de sangre se realizó en tubos de vacío (Vacutainer, BD) con heparina de sodio o con heparina de litio como anticoagulante (Figura 17a). Para la extracción de linfocitos se necesitaron 6 tubos de 4 ml de sangre cada uno (24 ml en total). Para el aislamiento añadimos en un tubo de 15 ml un volumen de 3 ml de Ficoll Paque Plus (Amersham Biosciences) (Figura 17b) y, con cuidado de no mezclarlo, se fue añadiendo 6 ml de sangre periférica con un ratio Ficoll:Sangre de 1:2. Posteriormente, se centrifugaron los tubos en una centrífuga Beckman sin freno a 2500 rpm durante 30 min. Tras el centrifugado se pudieron observar las diferentes capas (Figura 17c). Con una pipeta pasteur estéril se aisló la capa linfocitaria y se realizaron tres lavados con PBS para eliminar los restos de Ficoll que es tóxico para los linfocitos. De esta manera, los dos primeros lavados fueron a baja revolución para eliminar el Ficoll y las plaquetas, el tercero se llevó a cabo con un buffer de lisis de eritrocitos para lisar los posibles eritrocitos presentes en la muestra, ya que son muy inmunogénicos y presentan mucha afinidad por los siguientes anticuerpos que utilizaremos para el aislamiento. El pellet se disolvió en 1 ml de medio de cultivo DMEM con Glutamina suplementado con STF 10% y P/S 1%.

Aproximadamente se obtuvieron 1×10^6 células/ml con un rendimiento de células linfocitarias vivas del 82%. El conteo de células se llevó a cabo de forma manual tiñendo las células con Trypan Blue y contando con la ayuda de la cámara de Neubauer (Figura 17d).

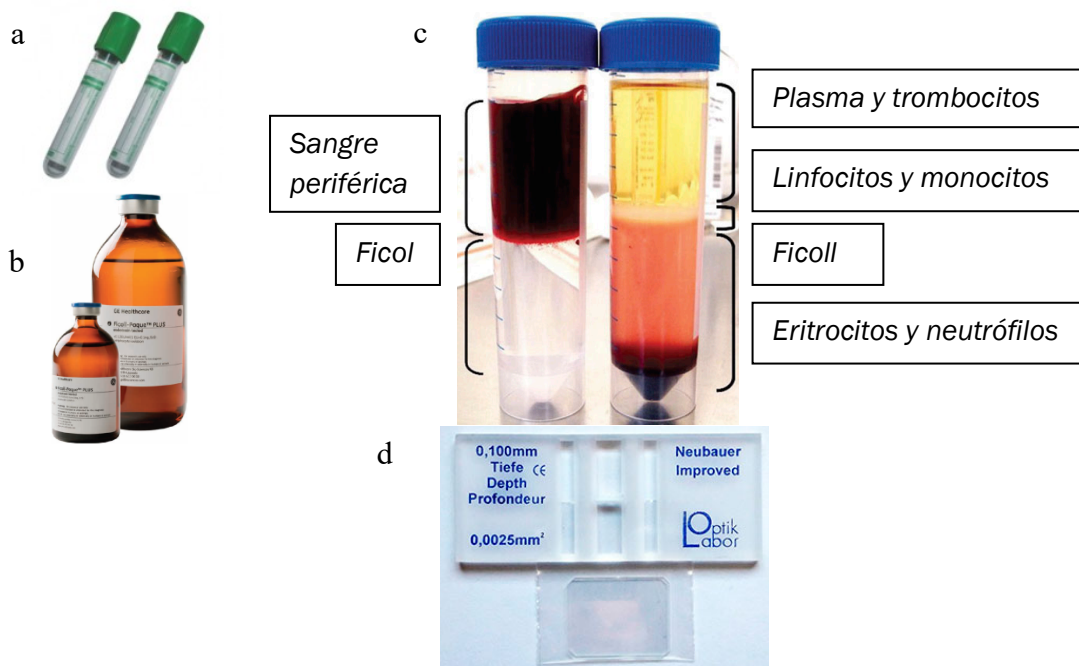


Figura 17. a) Vacutainer con heparina de sodio, b) Ficoll Paque y c) Tubos con la muestra antes y después de realizar la técnica. d) Imagen de cámara de Neubauer.

4.2.4 AISLAMIENTO DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS NK A PARTIR DE LA SERIE LEUCOCITARIA TOTAL

Para la separación de nuestra población de interés, es decir, la población de células NK, se utilizó el kit comercial NK Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotech).

El fundamento de esta técnica consiste en separar mediante selección negativa la población de NKs a partir de la serie linfocitaria. Para ello, se tomó la serie blanca aislada previamente y se incubó con el cocktail de anticuerpos primarios conjugados con biotina frente al resto de poblaciones celulares de la serie blanca, excluyendo a las células NK. A continuación, se añadió estreptavidina conjugada con microbolas magnéticas y se incubó durante 15 minutos. La muestra se hizo pasar a través de la columna magnética lentamente. Al ser una selección negativa, la población de interés se encuentra en la elución y no está marcada por ningún anticuerpo ni presenta microbolas magnéticas en su superficie que pueda interferir en el desarrollo de experimentos.

Para comprobar la eficiencia del aislamiento (porcentaje de población aislada y estado vital de las células), se realizó una citometría de flujo incubando las distintas fracciones con anticuerpo anti-FcγRIII conjugado con el fluorocromo FITC (*fluorescein isothiocyanate*). La adquisición de células se llevó a cabo en citómetro FACScanto II (Beckton Dickinson) y los resultados se analizaron con el software Cellquest 2.0. La población aislada presentó una viabilidad del 95% y una pureza del 70-80 % (Figura 18)

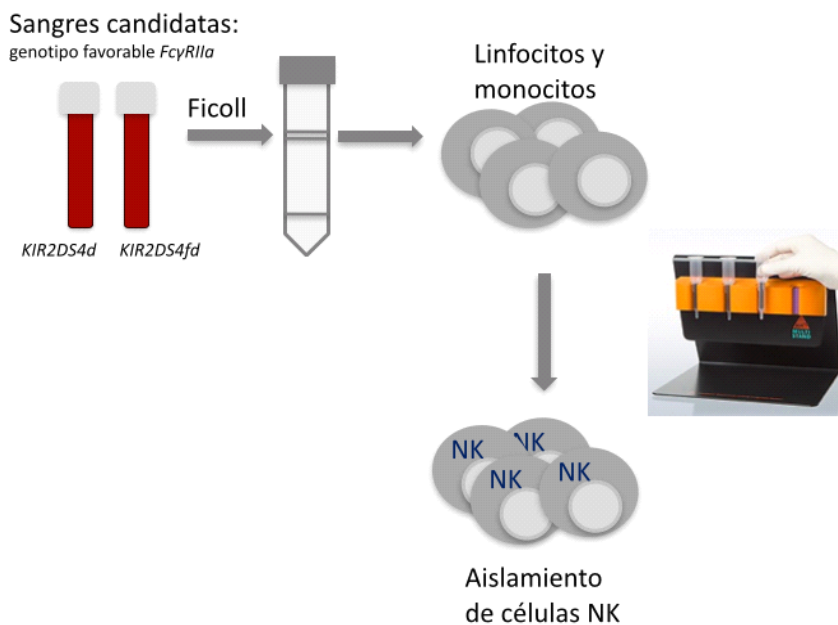


Figura 18. Imagen esquemática del proceso de aislamiento de células NK usando la metodología MACS (*Magnetic Associated Cell Sorting*) de Miltenyi.

4.2.5 ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS NK MEDIANTE IL-2

Con la finalidad de activar y estimular la proliferación de la población de células NK purificadas se incubaron con 100 µg/ml de IL-2 (Sigma-Aldrich) suplementando el medio de cultivo durante 24 horas en un incubador de CO₂ a 37°C en atmósfera húmeda.

4.2.6 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA A ADCC *IN VITRO*.

Para la determinación de la ADCC se utilizó el kit Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche) que se basa en la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) que se libera el medio de cultivo tras la lisis celular. Para definir el número de células tumorales necesario en cada punto del experimento se realizó una puesta a punto siguiendo el protocolo. Este número se estimaría con la mayor diferencia entre el control con mínima citotoxicidad y el control con máxima citotoxicidad. El control de máxima citotoxicidad se basó en añadirle un reactivo de lisis a los pocillos que en presencia de medio de cultivo con las células tumorales a testar. Por el contrario, los pocillos de mínima lisis son pocillos con medio de cultivo y células tumorales a los que no le añadimos ningún reactivo, y por ello, representan solamente la muerte basal del cultivo. La concentración elegida fue aquella en la que la diferencia entre la máxima y la mínima citotoxicidad era mayor de $0,15 \times 10^4$ células/pocillo en placa de 96 pocillos según recomendación del fabricante. Una vez determinado este punto, se llevó a cabo el experimento siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante e incluyendo todos los controles correspondientes para asegurar la correcta interpretación de los resultados. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado con 3 replicas del experimento (Figura 19).

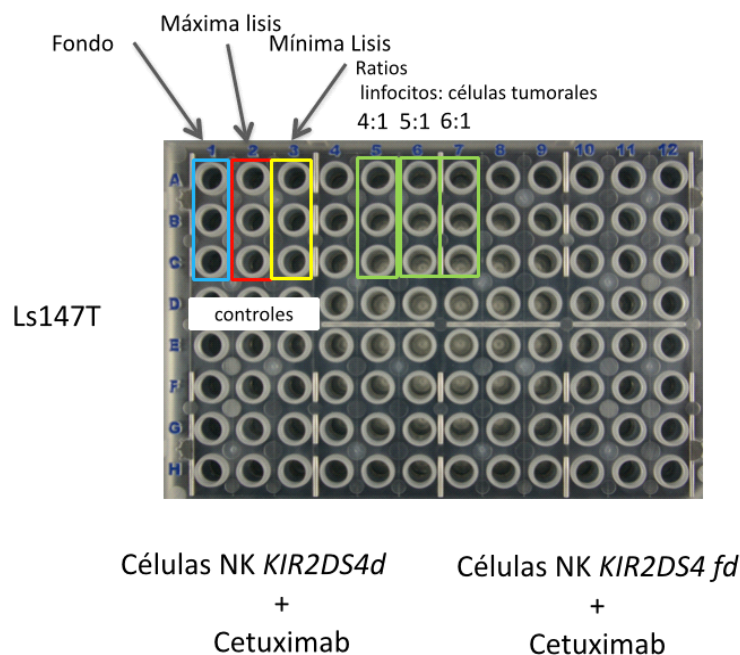


Figura 19. Figura esquemática del diseño de la placa de 96 pocillos para el experimento de medición de citotoxicidad. En los tres primeros pocillos podemos observar los controles de la técnica y en los sucesivos vemos los distintos ratios entre linfocitos:células tumorales. El primer triplicado corresponde al “valor de fondo” sin células tumorales ni células NK, solamente medio de cultivo.

4.2.6.1 PREPARACIÓN DEL CO-CULTIVO

Las células se tripsinizaron y se contaron. Posteriormente, se sembraron tanto en los pocillos control como en los pocillos experimentales.

Se contaron las células NK viables previamente aisladas, a continuación, se añadió el anticuerpo, en este caso cetuximab a una concentración de 1 ng/μl^{143 144 145 146 147}. Las células NK se sembraron sobre las células tumorales siguiendo los ratios 4:1, 5:1 y 6:1. El ensayo *in vitro* se incubó durante 4 horas antes de proceder al revelado del experimento¹⁴⁸.

4.2.6.2 MEDICIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

Para medir la absorbancia a 490nm se utilizó el espectrofotometro para placas de 96 pocillos Tecan con su software Magellan, y para el cálculo de la citotoxicidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad: } (\text{absorbancia del experimento} - \text{absorbancia del control con mínima citotoxicidad}) / (\text{absorbancia del control con máxima citotoxicidad} - \text{absorbancia del control con mínima absorbancia}) \times 10$$

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.3.1 ANÁLISIS UNI- Y MULTI-VARIANTE DE LOS RIESGOS PROPORCIONALES DE COX CON RESPECTO A LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y TIEMPO A LA PROGRESIÓN

Para evaluar el efecto de los diferentes marcadores genéticos y las distintas variables clínicas en la predicción del resultado respecto a la supervivencia global (SG) y respecto al tiempo hasta la progresión (TTP) de los pacientes se llevó a cabo un análisis univariante. Solamente aquellas variables estadísticamente significativas ($P < 0.05$) fueron consideradas como covariables en el análisis multivariante utilizando el modelo de regresión de Cox.

4.3.2 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

La supervivencia fue estimada mediante curvas de Kaplan-Meier y para determinar las diferencias entre los subgrupos se analizó con el test *log-rank*.

Consideramos resultados estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$ en un test de dos colas. Los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS Statistics versión 20.0.

4.3.3 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES

Los estudios de asociación se llevaron a cabo mediante tablas de contingencia 2x2 y se aplicó el test estadístico de Chi-cuadrado. Los resultados obtenidos se consideraron significativos cuando $P < 0.05$ en un test de dos colas.

4.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Los resultados obtenidos en los experimentos de citotoxicidad se analizaron mediante test no paramétricos de comparación de medias mediante U de Mann-Whitney. Consideramos resultados estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$ en un test de dos colas. Los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS Statistics versión 20.0.

5. RESULTADOS

5.1 DESCRIPTIVA DE LOS PACIENTES

El periodo de reclutamiento de este estudio multicéntrico se llevó a cabo desde septiembre de 2011 hasta diciembre de 2013 y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de los 13 hospitales participantes. Todos los parámetros clínicos fueron monitorizados y los pacientes fueron periódicamente observados hasta el fin del ensayo. En estos pacientes se determinaron los genes *KIR* y los polimorfismos de los genes *FcγRIIa* y *FcγRIIIa*. En aquellos pacientes de los que no teníamos la información concreta de la mutación *KRAS* se volvió a analizar en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Fundación Jiménez Díaz. Todos los datos de estos pacientes fueron registrados en una base de datos con todas las variables clínico-patológicas y moleculares para ser utilizadas posteriormente en los análisis estadísticos correspondientes.

Tras un análisis de 161 candidatos, fueron reclutados 71 pacientes seleccionados por cumplir todos los criterios de inclusión, tanto los clínicos como los moleculares. De este ensayo, un paciente salió prematuramente por criterio médico, dejando un tamaño muestral definitivo de 70 pacientes. Tras el reclutamiento, cada paciente recibió tratamiento adyuvante intravenoso con una dosis de cetuximab 500 mg/m² cada dos semanas. Este tratamiento se mantuvo hasta la progresión, la muerte del paciente o la revocación del consentimiento informado.

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Los pacientes incluidos estaban bien balanceados en cuanto al sexo ya que el 51.43% (n=36) de los pacientes fueron hombres y el 48.57% (n=34) mujeres. La mediana de edad en el estudio fue de 64 años, con un rango de entre 42 y 82 años. El estado general de los pacientes fue bueno con un ECOG=1 en el 72.86% (n=51), seguido de un ECOG=0 en el 18.57% (n=13) de los pacientes. Sólo el 8.57% (n=6) de los pacientes incluidos presentaron un ECOG=2.

En las Tablas 7 y 8 resumimos las características clínicas más relevantes de nuestra cohorte de pacientes.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Pacientes (N=70)		ECOG	N (%)
Mediana de edad en el diagnóstico (años)		0	13 (18.6)
Edad (rango)	64 (42-82)	1	51 (72.9)
Género	N (%)	2	6 (8.6)
Mujer	36 (51.4)	CEA basal (ng/dL)	N (%)
Hombre	34 (48.6)	≤ ULN	8 (11.4)
Tumor primario	N (%)	> ULN	60 (85.7)
Colon	52 (74.3)	N/A	2 (2.9)
Recto	18 (25.7)	LDH basal (UI/L)	N (%)
Número de sitios metastásicos	N (%)	≤ VNR	35 (50)
1	16 (22.8)	> VNR	30 (42.9)
2	27 (38.6)	N/A	5 (7.1)
3 o más	27 (38.6)	β2 microglobulina basal (mg/L)	N (%)
		≤ VNR	53 (75.7)
		> VNR	8 (11.4)
		N/D	9 (12.9)

N: tamaño muestral; VNR: Valores normales de referencia; N/D: no disponible

Tabla 8. Características morfológicas de los pacientes

	N	N/D	Media (SD)	Media CI 95%	Mediana [Q1, Q3]	Min, Max	Shapiro-Wilk
Edad	70	0	63.61 (10.54)	61.10, 66.13	64.00 [56.00, 72.00]	42.00, 82.00	0.0816
Peso (kg)	70	0	75.25 (17.79)	71.01, 79.49	74.00 [66.00, 83.00]	43.00, 160.00	<0.0001
Talla (cm)	70	0	164.17 (10.99)	161.55, 166.79	164.00 [155.00, 170.00]	146.00, 193.00	0.0630
Superficie Corporal (m ²)	70	0	1.81 (0.24)	1.76, 1.87	1.80 [1.65, 1.95]	1.30, 2.80	0.0053

N: tamaño muestral; N/D: No disponible; SD: desviación típica; CI: Intervalo de confianza; Q: primer cuartil; Q3: tercer cuartil; Min: mínimo; Max: máximo.

Tabla 9. Localización del tumor primario

	Total (N=70)
Localización del tumor primario	N (%)
Colon Sigmoide	21 (30.00)
Recto	18 (25.71)
Colon ascendente	13 (18.57)
Colon transverso	6 (8.57)
Colon descendente	6 (8.57)
Ciego	4 (5.71)
Unión Recto Sigma	2 (2.85)

En cuanto a la localización del tumor primario, el 28.57% (n=20) de los pacientes presentaron la localización en el segmento sigma, el 25.71% (n=18) se localizó en el recto, mientras que el 18.57% (n=13) de los pacientes lo tenían localizado en el colon ascendente (Tabla 9).

5.4 LOCALIZACIÓN DE LA METÁSTASIS

Los pacientes estuvieron muy bien balanceados en cuanto a la localización de las metástasis en hígado y pulmón. El 67.14% (n=47) de los pacientes presentó metástasis en el hígado, mientras que un 61.43% (n=43) las presentaron en el pulmón. Por otro lado, el 42.86% de los pacientes (n=30) presentó metástasis en los ganglios linfáticos y en menor porcentaje fue en hueso (10.00%, n=7). El 30.00% (n=21) de los casos presentaron metástasis en otra localización distinta a las anteriores, normalmente peritoneales, pero en ningún caso se presentaron metástasis cerebrales. (Tabla 10). Además, cabe destacar que un mismo paciente puede presentar más de una localización de las metástasis.

Tabla 10. Localización de las metástasis

	Total (N=70)
Localización metástasis*	N (%)
Hígado	47 (67.14)
Pulmón	43 (61.43)
Ganglios linfáticos	30 (42.86)
Cerebro	0 (0.00)
Hueso	7 (10.00)
Otra localización	21 (30.00)

5.5 GRADO HISTOPATOLÓGICO (G) Y CLASIFICACIÓN TNM

Alrededor de la mitad de los pacientes (54.29%, n=38) presentaron un grado 2 (G2), mientras que el 14.29% (n=10) presentaron grado 1 (G1). El grado 3 (G3) fue minoritario en nuestro estudio (8.57%, n=6). Sin embargo, no se pudo determinar el grado en un paciente (1.43%, n=1), y este dato fue desconocido en el 21.43% (n=15) de los pacientes.

En cuanto a la clasificación de la infiltración tumoral (T), la mayor parte de los pacientes presentaron estadios avanzados con un T3 en un 41.43% (n=29), seguidos de un T4 en un 27.14% (n=19). Los casos minoritarios fueron T1 y T2 con un 1 sólo caso (1.43%) y 3 casos (4.29%) respectivamente. No se pudo determinar este dato en el 25.71% de los casos (n=18).

En cuanto a los ganglios linfáticos afectados (N), 31.43% (n=22) de los pacientes presentaron N1, mientras que el 30.00% (n=21) presentaron N2, y el 10.00 % (n=7) no presentaron afectación ganglionar. Desafortunadamente, no se pudo determinar el grado de afectación ganglionar en el 28.57% (n=20) de los pacientes.

Al tratarse de pacientes con CCRm, el 98.57% (n=69) presentaron metástasis (M1). Sólo en un caso (1.43 %) no se pudo determinar la presencia o ausencia de metástasis (Tabla 11).

Tabla 11. Grado histopatológico y estadificación TNM de los pacientes reclutados en el estudio.

Total (N=70)	
Grado histopatológico (G)	N (%)
DESCONOCIDO	16 (22.85)
G1	10 (14.29)
G2	38 (54.29)
G3	6 (8.57)
GX	0
Estadio T	
T1	1 (1.43)
T2	3 (4.29)
T3	29 (41.43)
T4	19 (27.14)
TX	18 (25.71)
Estadio N	
N0	7 (10.00)
N1	22 (31.43)
N2	21 (30.00)
NX	20 (28.57)
Estadio M	
M1	69 (98.57)
MX	1 (1.43)

5.6 EXPRESIÓN DEL EGFR Y ESTUDIO MUTACIONAL DE KRAS

La expresión del EGFR y la mutación de *KRAS* eran criterios de inclusión. Resumimos en las siguientes tablas las frecuencias encontradas de las mutaciones en el gen *KRAS* (Tabla 12) y la intensidad de expresión del EGFR (Tabla 13) en nuestra cohorte de paciente

Tabla 12. Mutaciones de *KRAS*

Total (N=70)	
Codones mutados en <i>KRAS</i>	N (%)
c.35G>A (p. G12D)	18 (25.71)
c.35G>T (p. G12V)	15 (21.43)
c.38G>A (p. G13D)	14 (20.00)
c.34G>T (p. G12C)	4 (5.71)
c.34G>A (p. G12S)	6 (8.57)
c.35G>C (p. G12A)	3 (4.29)
c.34G>C (p. G12R)	1 (1.43)
c.37G>T (p. G13C)	1 (1.43)
N/D*	8 (11.43)

Tabla 13. Intensidad de EGFR

Total (N=70)	
Expresión del EGFR (intensidad)	N (%)
+	34 (48.57)
++	34 (48.57)
+++	2 (2.86)

N: número de pacientes; D: aspártico; V: valina; C: cisteína; S: serina; A: alanina; R: arginina; T: treonina. N/D : no disponible
 *Estos pacientes son *KRAS* mutado, pero no disponemos de la información de la mutación concreta de *KRAS* debido a que se determinó en el centro de procedencia con el kit de Cobas. Tampoco fue posible recuperar un bloque tumoral del paciente para su determinación en el Hospital Fundación Jiménez Díaz mediante la tecnología Rotor-Q gene (Qiagen).

5.7 ANÁLISIS DE CEA, B2M Y LDH

La implicación en el CCRm de las variables clínicas CEA (antígeno carcinoembrionario), β2M (beta-2-microglobulina) y LDH (lactato deshidrogenasa) ya ha sido descrita previamente^{149 150 151}. Es por ello por lo que cuantificamos dichas variables en nuestra serie de pacientes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla 14):

Tabla 14. Determinación de CEA, β2M y LDH en los pacientes con CCRm.

	N	N/D	Media (SD)	Media (IC 95%)	Mediana [Q1, Q3]	Min, Max	Shapiro-Wilk (P)
CEA (mg/L)	68	2	257.30 (583.74)	116.01, 398.60	48.80 [12.55, 139.25]	0.09, 2929.70	<0.0001
β2M (mg/L)	61	9	2.35 (0.58)	2.20, 2.50	2.12 [2.00, 2.70]	1.35, 3.80	0.0080
LDH (UI/l)	65	5	630.05 (901.68)	406.62, 853.47	324.00 [222.00, 584.00]	150.00, 5882.00	<0.0001

N: tamaño muestral; N/D: dato no disponible; SD desviación típica; IC: Intervalo de confianza; Q1: cuartil; Q3: cuartil 3; Min: mínimo; Max: máximo.

5.8 TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES

5.8.1 ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO

El esquema de tratamiento que recibieron los pacientes incluidos en el estudio consistió en la administración intravenosa cada 15 días en dosis de 500mg/m² del anticuerpo monoclonal anti-EGFR IgG1, cetuximab.

5.8.2 TIEMPO DE TRATAMIENTO Y NÚMERO DE CICLOS ADMINISTRADOS

Se define el “tiempo de tratamiento” como el tiempo transcurrido, en meses, desde el inicio del tratamiento hasta la fecha de última dosis indicada. El protocolo de tratamiento indica que para respetar la duración total del ciclo, a la fecha de última dosis se le debe sumar 15 días. La mediana del tiempo de tratamiento de los pacientes incluidos en el estudio fue de 2.57 meses, oscilando entre un mínimo de 0.49 meses y un máximo de 15.98 meses.

5.8.3 NÚMERO DE CICLOS ADMINISTRADOS

A los 70 pacientes se les administró una mediana de 4 ciclos de cetuximab (rango de 1 a 32 ciclos) (Tabla 15).

Tabla 15. Número de ciclos administrados

	N	N/D	Media (SD)	Media IC 95%	Mediana [Q1, Q3]	Min, Max	Shapiro-Wilk
Nº de ciclos	70	0	5.21 (4.72)	4.09, 6.34	4.00 [3.00, 5.00]	1.00, 32.00	<0.0001

N: tamaño muestral; N/D: no disponible; DS: desviación típica; IC: Intervalo de confianza; Q1: Primer cuartil; Q3: tercer cuartil; Min: mínimo; M: Máximo.

5.9 FIN DEL ESTUDIO Y FALLECIMIENTO DE LOS PACIENTES

El 14.29% (n=10) de los pacientes analizados finalizaron el estudio tras 12 meses de seguimiento desde el comienzo del tratamiento. En cambio, el 85.71% (n=60) terminaron el estudio prematuramente. De ellos, el 77.14% (n=54) de los pacientes fallecieron antes de terminar el estudio. Además, hubo un 7.14% (n=5) de pérdidas de seguimiento y el 1.43% (n=1) de los pacientes se excluyó del estudio por algún criterio médico.

En el transcurso de este ensayo fallecieron el 80% (n=56) de los pacientes incluidos. De esos 56 pacientes, el 82.14% (n=46) murieron a causa de la progresión de la enfermedad, el 14.29% (n=8) por causa desconocida y un 3.57% (n=2) de los pacientes fallecieron por algún acontecimiento adverso debido al fármaco. El 20% (n=14) restante permaneció con vida a lo largo del ensayo.

5.10 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Para los análisis de supervivencia se utilizaron curvas de Kaplan-Meier y la significancia estadística se determinó mediante el test de log-rank. Para ello, se definió el “tiempo desde el diagnóstico” al tiempo transcurrido, en años, desde la fecha de diagnóstico de la enfermedad en cualquier estadio, hasta la fecha de firma consentimiento informado para participar en el ensayo clínico. La mediana del tiempo desde el diagnóstico fue 2.29 años (Tabla 16).

Se define el “tiempo de seguimiento” como el tiempo transcurrido, en meses, desde la fecha de firma del consentimiento informado hasta la fecha de fin de estudio o último contacto con el paciente. La mediana de seguimiento para los pacientes incluidos en el estudio fue de 6.35 meses (Tabla 16).

Se define el “tiempo hasta la progresión” (TTP) como el tiempo transcurrido, en meses, desde la fecha de firma del consentimiento informado por parte del paciente hasta la fecha de progresión o fecha de muerte debida a la progresión de la enfermedad. Aquellos pacientes que no progresaron ni murieron por la enfermedad a lo largo de estudio se censuraron. Para el análisis estadístico del tiempo hasta la progresión, el evento considerado fue la progresión de la enfermedad o muerte por progresión de los pacientes.

Tabla 16. Tiempo desde el diagnóstico de los pacientes incluidos en el ensayo clínico y tiempo de seguimiento de los pacientes incluidos en el ensayo.

	N	Falta	Media (SD)	Media IC 95%	Mediana [Q1, Q3]	Min, Max	Shapiro-Wilk
Tiempo desde el diagnóstico (años)	69	1*	2.77 (1.72)	2.36, 3.18	2.29 [1.56, 3.08]	0.04, 9.00	<0.0001
Tiempo de seguimiento (meses)	70	0	7.21 (4.02)	6.25, 8.17	6.35 [3.75, 10.25]	1.25, 16.60	0.0022

N: tamaño muestral; DS: desviación típica; CI: Intervalo de confianza; Q1: Primer cuartil; Q3: tercer cuartil; Min: mínimo; M: Máximo.

5.10.1 SUPERVIVENCIA GLOBAL Y TIEMPO HASTA LA PROGRESIÓN

El objetivo principal del ensayo fue estudiar la supervivencia global (SG) de los pacientes.

Se define SG como el tiempo transcurrido (en meses) desde el día de inclusión del paciente en el presente ensayo clínico hasta el día que se produce la muerte por cualquier causa. Los pacientes no fallecidos en la fecha de último contacto fueron censurados. El evento que se consideró fue la muerte del paciente. Aquí, el 80% (n=56) de los pacientes analizados presentaron evento de muerte, por el contrario, el 20% (n=14) restante fueron censurados al no fallecer durante el estudio. El resultado del análisis de supervivencia reveló que la mediana de supervivencia global fue de 6.71 meses con un rango de entre 3.75 y 10.25 meses (Tabla 17; Figura 20a).

Por otra parte, el 92.86% (n=65) de los pacientes presentaron evento de progresión. De ellos, 62 pacientes presentaron progresión de la enfermedad y 3 murieron a causa de la progresión de la enfermedad. La mediana del tiempo hasta la progresión fue de 2.56 meses (Tabla 18; Figura 20b).

Tabla 17. Análisis de la supervivencia global

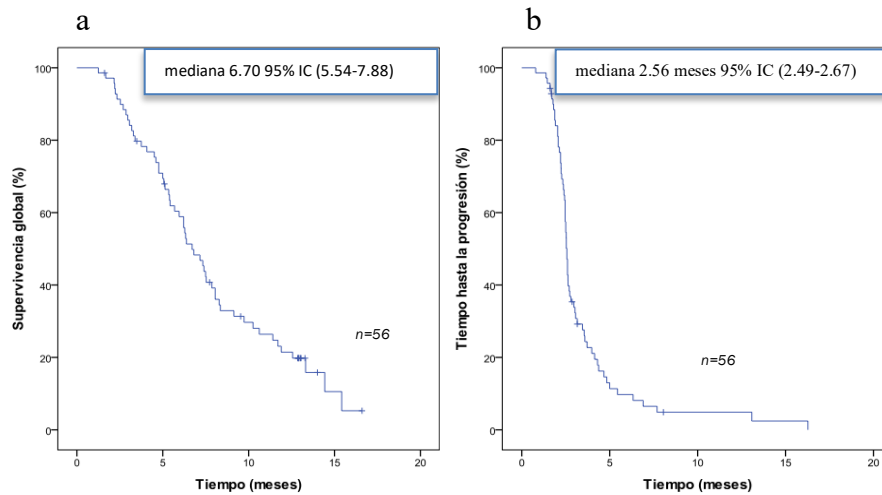
Resumen de eventos	Total N (%)
Nº de pacientes	70 (100)
Nº de pacientes con evento	56 (80.00%)
Nº de pacientes censurados	14 (20.00%)
Tiempo desde consentimiento informado (meses)	
Mediana (IC 95%)	6.71 (5.42, 8.05)
Percentiles 25-75	4.60 - 11.41
Porcentaje de Supervivencia (% , IC 95%)	
0 Meses	100.00 (100.00, 100.00)
3 Meses	85.53 (74.77, 91.94)
6 Meses	58.86 (46.22, 69.49)
9 Meses	32.91 (21.98, 44.26)
12 Meses	21.45 (12.38, 32.16)
15 Meses	10.56 (2.82, 24.25)

N: tamaño muestral; IC: Intervalo de confianza

Tabla 18. Análisis del tiempo hasta la progresión de los pacientes incluidos en el ensayo clínico.

Resumen de eventos	Total N (%)
Nº de pacientes	70 (100)
Nº de pacientes con evento	65 (92.86)
Primer evento presentado:	
Progresión	62 (88.57)
Muerte por progresión	3 (4.29)
Nº de pacientes censurados	5 (7.14)
Tiempo hasta la progresión (meses)	
Mediana (IC 95%)	2.56 (2.47, 2.70)
Percentiles 25-75	2.20 - 3.58
Porcentaje de Supervivencia (% , IC 95%)	
0 Meses	100.00 (100.00, 100.00)
3 Meses	33.83 (22.91, 45.06)
6 Meses	9.74 (4.01, 18.52)
9 Meses	4.87 (1.30, 12.23)
12 Meses	4.87 (1.30, 12.23)
15 Meses	2.43 (0.25, 9.94)

Figura 20. Análisis de supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio. a) Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global. b) Curva de Kaplan-Meier para el tiempo hasta la progresión. Las cajas superior derecha muestra el resultados del análisis de supervivencia por Cox.



5.10.2 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE LAS VARIABLES CLÍNICAS

Realizamos un análisis univariante de regresión de Cox para evaluar la implicación de las variables clínicas más relevantes con respecto a la supervivencia global y al tiempo hasta la progresión. Como podemos observar en la Tabla 19, la única variable que mostró un resultado estadísticamente significativo en cuanto a la supervivencia global y al tiempo a la progresión fue la variable “número de sitios metastásicos”. Más concretamente encontramos resultados estadísticamente significativos cuando comparamos el grupo que tenía tres o más metástasis frente a los que solamente presentaban una metástasis tanto en SG ($P=0.009$) como en TTP ($P=0.007$) (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis univariante de regresión de Cox para supervivencia global y tiempo hasta la progresión con las variables clínico-patológicas registradas en el estudio.

	Supervivencia Global		Tiempo hasta la progresión	
	P	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)
Sexo (mujer vs. hombre)	0.568	1.17 (0.69-1.98)	0.549	1.17 (0.71-1.92)
Edad (≥ 60 vs. < 60)	0.824	0.94 (0.51-1.70)	0.335	1.30 (0.76-2.22)
Localización del tumor primario (recto vs. colon)	0.687	1.13 (0.63-2.04)	0.466	1.24 (0.70-2.18)
Mutación G13D <i>KRAS</i>	0.444	0.76 (0.37-1.55)	0.371	1.33 (0.71-2.46)
ECOG (1&2 vs. 0)	0.384	1.38 (0.67-2.821)	0.630	1.16 (0.63-2.15)
CEA ($> \text{VNR}$ vs. $\leq \text{VNR}$)	0.376	1.47 (0.63-3.45)	0.288	1.54 (0.70-3.40)
LDH ($> \text{VNR}$ vs. $\leq \text{VNR}$)	0.465	1.23 (0.71-2.15)	0.520	1.18 (0.71-1.98)
$\beta 2\text{M}$ ($> \text{VNR}$ vs. $\leq \text{VNR}$)	0.678	0.85 (0.40-1.83)	0.767	0.89 (0.42-1.90)
Número de sitios metastásicos				
2 vs. 1	0.069	2.00 (0.95-4.22)	0.172	1.61 (0.81-3.18)
3 o más vs. 1	0.009	2.75 (1.28-5.89)	0.007	2.53 (1.29-4.97)

P: probabilidad; HR: Hazard ratio; CI: Intervalo de confianza; VNR: valores normales de referencia.

5.10.3 ESTUDIO DE LAS METÁSTASIS

Tal y como citamos anteriormente, en nuestra base de datos recogimos la información relativa acerca del número de sitios metastásicos que presentaban los pacientes, así como el lugar de dichas metástasis. Además, el análisis univariante de Cox reveló que el número de sitios metastásicos estaba relacionado con la supervivencia; por ello, decidimos profundizar en ello.

En estos análisis, un 67.14% (n=47) de los pacientes de nuestro ensayo presentaron metástasis hepáticas y un 61.43% (n=43) en pulmón. Dado que estos dos tipos de metástasis son los órganos más frecuentes en las que el CCR presenta metástasis, quisimos ampliar nuestro estudio de polimorfismos mediante asociación con las metástasis para verificar si existe algún tipo de interacción entre los polimorfismos estudiados y el lugar de metástasis (hígado y/o pulmón).

5.10.3.1 ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y TIEMPO A LA PROGRESIÓN DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE METÁSTASIS HEPÁTICAS

Para ello, realizamos un análisis de supervivencia global (SG) y de tiempo hasta la progresión (TTP) para comparar el pronóstico de los pacientes que presentaban metástasis hepáticas con aquellos que presentaban metástasis en otros lugares (pulmón, peritoneo, ganglionar, etc.). Hemos de destacar que aquellos pacientes con presencia de metástasis en hígado, también podían presentar metástasis en otros lugares.

Las curvas de Kaplan-Meier y el análisis de log rank para SG reveló que la mediana de supervivencia para los pacientes sin metástasis hepáticas era de 8.285 meses (rango: 3.963-12.607 meses) mientras que la mediana de supervivencia para los pacientes con metástasis hepáticas era de 6.214 meses (rango: 5.090-7.338 meses) ($P=0.022$; Figura 20a). Respecto al TTP, los pacientes sin metástasis hepáticas presentaban una mediana del TTP superior (3.452 meses; rango: 2.281-4.623 meses) frente a aquellos pacientes con metástasis hepáticas (2.499 meses; rango: 2.394-2.603 meses) ($P=0.001$; Figura 20b). De estos resultados podemos concluir que aquellos pacientes que presentaban metástasis hepáticas en hígado progresaban antes y tenían una supervivencia global menor que el resto de pacientes que no presentaban ese lugar metastásico. Asimismo, los resultados de los análisis de regresión de Cox, revelaron que aquellos pacientes con metástasis hepáticas tenían una supervivencia global menor ($P=0.024$; HR 1.95; 95% IC (1.09-3.47); Figura 21a), y un tiempo hasta la progresión más corto ($P=0.002$; HR 2.552; 95% IC (1.42-4.58); Figura 21b).

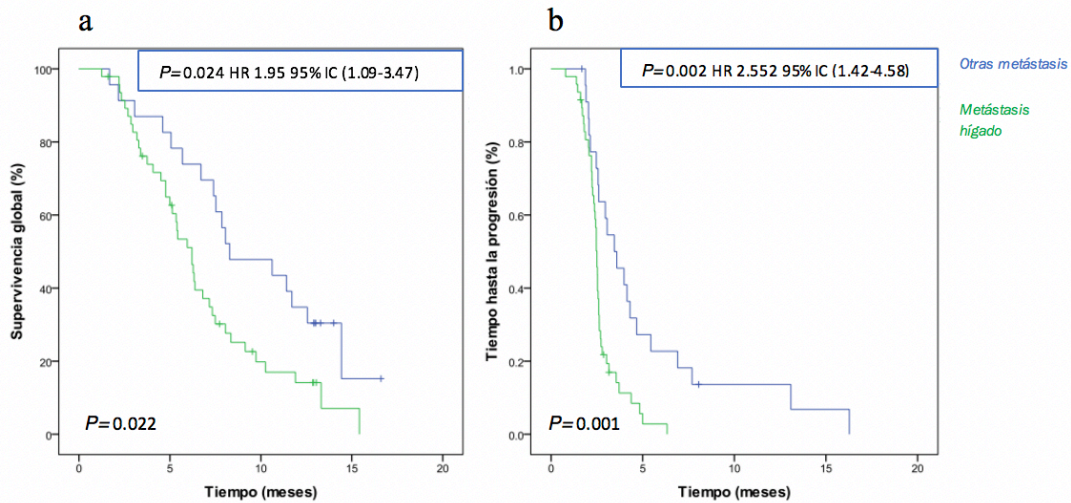


Figura 21. Análisis de supervivencia de los pacientes en función de la presencia de metástasis hepáticas. a) Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los pacientes con metástasis hepáticas. Gráfico de Kaplan-Meier de supervivencia global para pacientes que presentaban metástasis hepática frente a aquellos pacientes que presentaban otro lugar metastásico. b) Curva de Kaplan-Meier para el tiempo hasta la progresión de los pacientes con metástasis hepáticas frente a aquellos pacientes que presentaban otro lugar metastásico. Las cajas superior derechas muestra el resultados del análisis de supervivencia por Cox. HR: Hazard Ratio; IC: intervalo de confianza para el 95%.

Aquellos pacientes que presentaban metástasis hepáticas tenían una peor supervivencia global que aquellos pacientes que no presentaban metástasis en el hígado ($P=0.022$). Aquellos pacientes que presentaban metástasis hepáticas progresaban antes que aquellos pacientes que no presentaban metástasis en el hígado ($P=0.001$).

Tras comprobar que la presencia de metástasis hepáticas está asociada significativamente a la supervivencia de los pacientes, llevamos a cabo el mismo análisis con las metástasis pulmonares para estudiar su papel pronóstico. Sin embargo, al enfrentar a aquellos pacientes que tenían metástasis pulmonares frente a otro tipo de metástasis, no obtuvimos ningún resultado significativo ni en supervivencia global ni en tiempo hasta la progresión (datos no mostrados). De este análisis concluimos que la presencia de metástasis pulmonares no afectan al pronóstico de los pacientes con CCRm.

5.10.3.2 ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE METÁSTASIS HEPÁTICAS O PULMONARES DE MANERA EXCLUYENTE

Un objetivo secundario de nuestro análisis fue realizar un estudio de supervivencia global y de tiempo hasta la progresión estableciendo nuevos grupos: aquellos pacientes que presentaban

solamente metástasis hepáticas frente a aquellos pacientes que no presentaban metástasis hepáticas. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos (dato no mostrado).

Por otra parte, realizamos la misma aproximación, esta vez enfrentando a pacientes que presentaban metástasis en el pulmón pero no en el hígado. En este caso, los pacientes que solamente presentaban metástasis en el pulmón se beneficiaron tanto de una mayor SG ($P=0.048$; Figura 22a) como de un mayor TTP ($P=0.005$; Figura 22b). De hecho, la mediana de SG para los pacientes sin metástasis en el pulmón fue de 6.279 meses (rango: 5.2-7.359 meses) mientras que la mediana de SG para los pacientes con metástasis pulmonares fue de 10.619 meses (rango: 6.110-15.128 meses). En el caso del análisis de TTP, la mediana de TTP para los pacientes sin metástasis pulmonares fue de 2.499 meses (rango: 2.421-2.576 meses); mientras que para aquellos que presentaban metástasis pulmonares fue de 3.584 meses (rango: 2.553-4.615 meses).

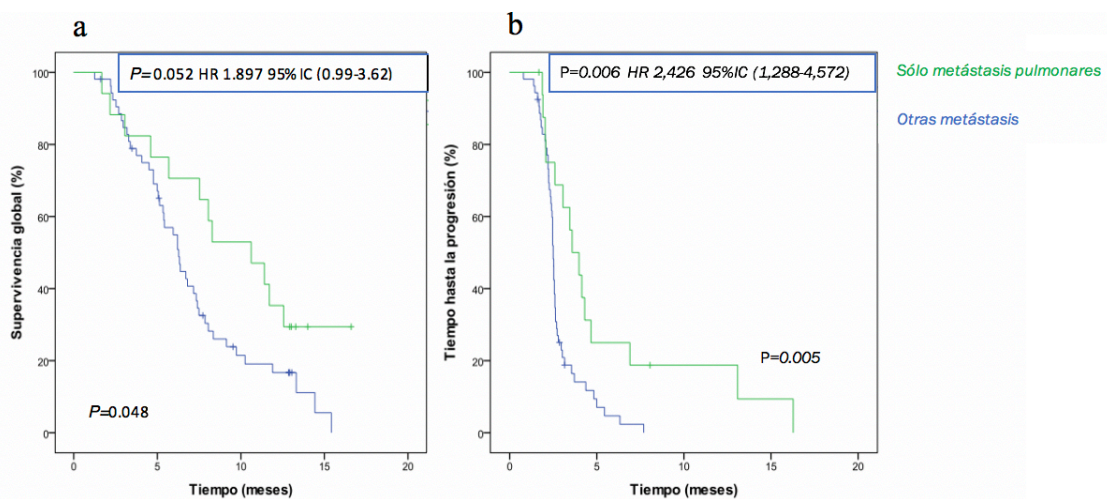


Figura 22. Análisis de supervivencia de los pacientes en función de la presencia de metástasis hepáticas o pulmonares. a) Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de pacientes con metástasis pulmonares pero no hepáticas. La caja superior derecha muestra el resultado del análisis de supervivencia por Cox. b) Curva de Kaplan-Meier para el tiempo hasta la progresión de pacientes con metástasis pulmonares pero no hepáticas. La caja superior derecha muestra el resultado del análisis de supervivencia por Cox. HR: Hazard Ratio; IC: intervalo de confianza para el 95%.

5.10.3.3 ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES QUE SOLAMENTE PRESENTABAN UNA METÁSTASIS EN HÍGADO O UNA METÁSTASIS EN PULMÓN.

A pesar de haber separado en dos grupos excluyentes a aquellos pacientes con metástasis hepáticas o pulmonares, los grupos son bastante heterogéneos ya que un mismo paciente puede presentar una metástasis hepática y al mismo tiempo presentar metástasis en otras localizaciones.

Para estudiar el valor pronóstico que tiene la localización de la metástasis, bien sea en hígado o otros órganos decidimos establecer tres grupos: en el primero se incluyeron aquellos pacientes que solamente presentaban un sitio metastásico localizado en el hígado, en el segundo aquellos que solamente presentaban un lugar metastásico en pulmón, y en el tercer grupo, aquellos pacientes con dos o más sitios metastásicos sin especificar lugar.

En estos análisis excluimos a los pacientes que presentaron una única metástasis distinta a hígado o pulmón por presentar un tamaño muestral muy pequeño ($n=5$). Respecto a la SG, el resultado del análisis de Kaplan-Meier mostró, que aquellos pacientes que solamente mostraban un lugar metastásico en pulmón tenían una mayor supervivencia global que el resto y presentaron una mediana de supervivencia de 12.559 meses; mientras que el resto de pacientes presentaron una mediana de supervivencia global de 6.279 meses ($P=0.018$; Figura 22a). Los pacientes que tenían una sola metástasis en hígado *versus* varias metástasis en hígado no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P=n.s.$). Esto implica que para un paciente con CCR metastásico es de mejor pronóstico tener un único lugar metastásico en pulmón, que presentar metástasis hepáticas en dos o más sitios (Figura 23a). A continuación estudiamos el pronóstico de los pacientes en función de si presentan metástasis hepáticas, pulmonares o en varios sitios metastásicos en el hígado respecto al tiempo a la progresión. Aquí, también encontramos que aquellos pacientes que mostraban solamente un sitio metastásico en pulmón progresaban más tarde que aquellos que tenían un sitio metastásico o varios en el hígado ($P=0,033$; Figura 23b). Además, no se encontró ninguna diferencia entre los pacientes que tenían un sitio metastásico o varios en el hígado ($P=n.s.$, Figura 22b)

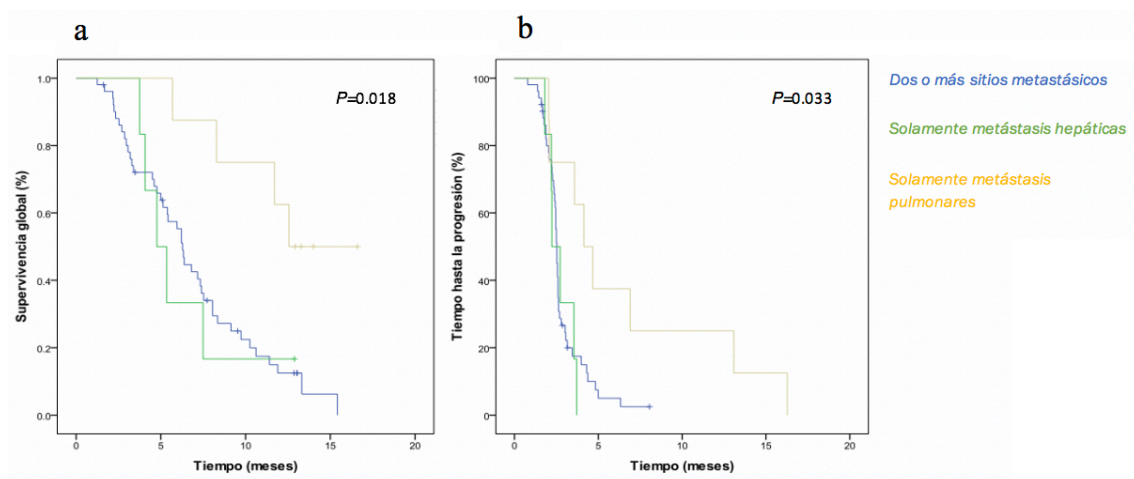


Figura 23. Análisis de supervivencia de los pacientes en función de la presencia de metástasis hepáticas, pulmonares o en varios sitios metastásicos. a) Curvas de Kaplan-Meier para el estudio de la supervivencia global de los pacientes. b) Curvas de Kaplan-Meier para el estudio del tiempo hasta la progresión de los pacientes.

5.10.3.4 ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE PRESENTAR UNA ÚNICA METÁSTASIS HEPÁTICA FRENTE A UNA ÚNICA METÁSTASIS PULMONAR

Finalmente, decidimos centrarnos solamente en aquellos pacientes que sólo mostraban un lugar metastásico bien en hígado o bien en pulmón. De nuevo, observamos que, la SG fue mayor en aquellos pacientes que mostraban metástasis solamente en pulmón con una mediana de supervivencia de 12.559 meses. Mientras que los que presentaban metástasis en el hígado mostraron una mediana de supervivencia de 4.767 meses (rango: 3.240-6.295 meses; $P=0.032$) (Figura 24a). De igual manera, el estudio del TTP mostró que aquellos pacientes con una metástasis en pulmón presentan una mediana de TTP de 4.142 meses (rango: 2.639-5.646 meses) mientras aquellos que solamente tenían un sitio metastásico en hígado progresaban antes 2.231 meses (rango: 1.604-2.858 meses; $P=0.028$) (Figura 24b).

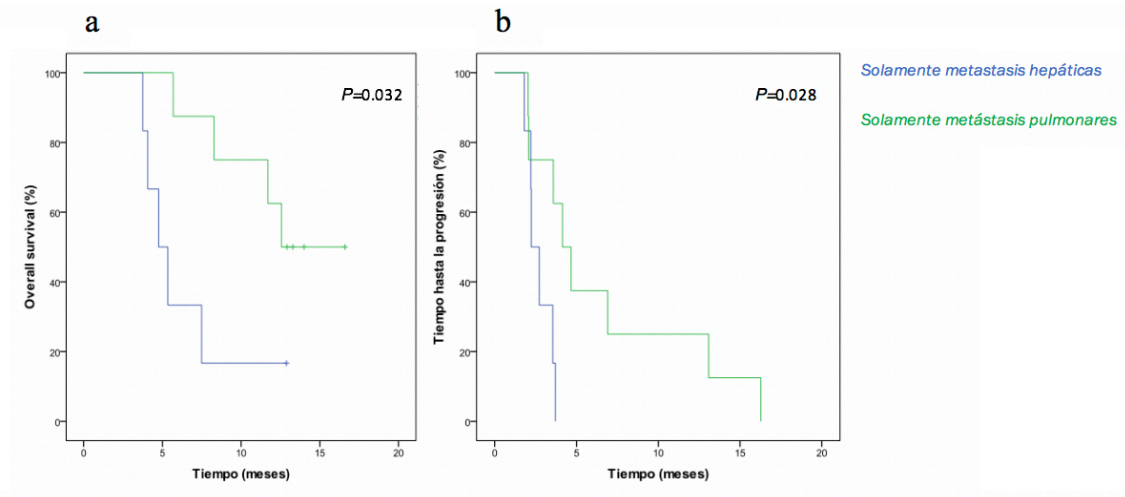


Figura 24. Análisis de supervivencia de los pacientes en función de presentar una única metástasis hepática frente a una única metástasis pulmonar. a) Curvas de Kaplan Meier para Supervivencia global. b) Curvas de Kaplan Meier para el tiempo hasta la progresión.

5.10.4 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA EN FUNCIÓN DEL POLIMORFISMO *FcγRIIIA-V158F* Y EN FUNCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES *KIR*. IMPLICACIÓN EN LA RESPUESTA FRENTE A ADCC MEDIADA POR ANTICUERPOS IgG1.

Analizamos la implicación del polimorfismo *FcγRIIIa-V158F* y de los genes *KIR* tanto en la supervivencia como en la respuesta a ADCC. La frecuencia, tanto de los polimorfismos de *FcγRIIIa* como de los polimorfismos en los genes *KIR* viene descrita en la Tabla 20. Para ello, realizamos un análisis univariante del polimorfismo *FcγRIIIa* tanto para la supervivencia global como para la supervivencia libre de progresión. Sin embargo, el análisis univariante de Cox no

mostraron una ventaja significativa en ninguna de sus variantes alélicas del *FcγRIIIa* (VV, VF o FF) en cuanto a supervivencia global (HR 1.05; 95%CI 0.61-1.79; $P=0.864$), o tiempo a la progresión (HR 0.79; 95%CI 0.48-1.31; $P=0.363$) (Tabla 21).

Tabla 20. Frecuencias de los polimorfismos *FcγRIIIa* (H131R), *FcγRIIIa* (V158F) y los genes *KIR* (*KIR2DS4*) de los pacientes incluidos en el estudio.

KIR2DS4	Total N (%)	Total (N=70)	
null	6 (8.57)	FcγRIIIa (H131R)	N (%)
full/full	4 (5.71)	H/H	27 (38.57)
del/del	50 (71.43)	R/H	43 (61.43)
full-del	10 (14.29)	FcγRIIIa (V158F)	N (%)
Total	70 (100)	V/V	6 (8.57)
		F/F	28 (40.00)
		F/V	36 (51.43)

H: histidina, R: arginina; V: valina; F: fenilalanina; *null*: ausencia del gen; *full*: variante completa; *del*: variante deletada; *full/del*: variante heterocigótica; N: tamaño muestral.

5.10.5 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA RELATIVO A LOS DISTINTOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *KIR*

La determinación de los distintos polimorfismos de los genes *KIR* se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real de todos los pacientes incluidos en el estudio. Posteriormente, realizamos un análisis univariante por regresión de Cox respecto a la SG de cada polimorfismo y solamente el polimorfismo *KIR2DS4* mostró una tendencia a la significancia (HR=1.79; IC95%=0.95-3.36; $P=0.071$) (Tabla 21). Sin embargo, el análisis para el TTP del mismo polimorfismo no mostró diferencias estadísticamente significativas (HR=0.95; IC95%=0.50-1.78; $P=0.872$) (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de regresión de Cox para las distintas variantes de los polimorfismos en el gen KIR y el polimorfismo FcγRIIIa-158F/V con respecto a la supervivencia global y el tiempo hasta la progresión.

	Supervivencia Global		Tiempo hasta la progresión	
	P	HR (95% IC)	P	HR (95% IC)
<i>FcγRIIIa 158F/V</i>	0.864	1.05 (0.61-1.79)	0.363	0.79 (0.48-1.31)
<i>KIR2DL2</i>	0.909	1.03 (0.60-1.76)	0.444	0.83 (0.50-1.35)
<i>KIR2DL5A</i>	0.934	1.02 (0.60-1.76)	0.754	0.92 (0.55-1.54)
<i>KIR2DL5B</i>	0.880	0.96 (0.53-1.73)	0.209	0.70 (0.40-1.22)
<i>KIR2DS1</i>	0.776	1.08 (0.63-1.86)	0.888	0.97 (0.59-1.58)
<i>KIR2DS2</i>	0.967	0.99 (0.58-1.69)	0.349	0.79 (0.48-1.29)
<i>KIR2DS3</i>	0.587	1.16 (0.68-1.97)	0.292	0.76 (0.46-1.26)
<i>KIR2DS4</i>	0.071	1.79 (0.95-3.36)	0.872	0.95 (0.50-1.78)
<i>KIR3DS1</i>	0.520	1.19 (0.70-2.05)	1.000	1.00 (0.60-1.67)
<i>KIR3DPI</i>	0.888	1.04 (0.59-1.85)	0.562	1.18 (0.67-2.07)

P: probabilidad; HR: Hazard ratio (razón de riesgo); IC: Intervalo de confianza

5.10.5.1 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIANTES DEL POLIMORFISMO KIR2DS4

Tras analizar los distintos polimorfismos y obtener una tendencia cercana a la significancia del *KIR2DS4* ($P=0.071$) en cuanto a supervivencia global, decidimos profundizar nuestro análisis analizando las distintas variantes alélicas de dicho gen.

En un primer lugar, mediante una curva de Kaplan Meier y análisis por log rank se evaluó la supervivencia global de las cuatro variantes alélicas (Figura 25) que podía presentar un paciente: homocigótica para variante completa (*full/full*, *FF*), homocigótica para variante delecionada (*del/del*, *DD*), heterocigótica (*full/del*, *FD*), o ausencia de la variante (*Null*). Sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las variantes del gen *KIR2DS4* ni en la SG ($P=0.118$) (Figura 25a), ni en el TTP de los pacientes ($P=0.547$) (Figura 25b).

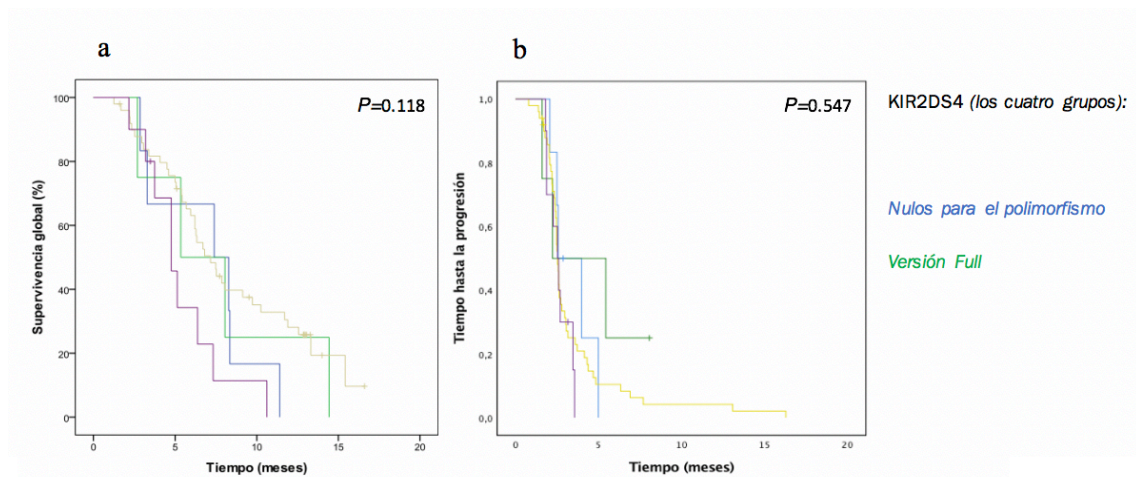


Figura 25. Análisis de supervivencia de los pacientes en función de las distintas variantes del polimorfismo *KIR2DS4*. Curvas de Kaplan Meier para a) supervivencia global y b) tiempo hasta la progresión.

Aunque el resultado obtenido no fue estadísticamente significativo, observando las distintas curvas podemos apreciar dos comportamientos distintos entre los pacientes con una variante heterocigota (*full/del*) del gen y aquellos con una versión delecionada (*del/del*).

Se ha descrito que aquellos pacientes con la versión heterocigota (*full/del*) responden peor a ciertas terapias y presentan una progresión más temprana que la versión delecionada (*del/del*)¹⁴⁰¹³⁹. Por otra parte, algunos trabajos recientes han demostrado que los pacientes con *KIR2DS4del* poseen una deleción de 22 pb que provoca un codón de parada prematuro¹⁵², por lo que pierde la región transmembrana y la región extracelular dando como resultado una proteína insoluble incapaz de anclarse a membrana. Por esta razón, decidimos agrupar a los pacientes que no tuviesen receptor funcional, es decir, pacientes que no presentaran el gen (*Null*) y los pacientes con la versión delecionada (*del/del*) y les llamariamos pacientes con receptor no funcional (RNF), para compararlos con aquellos que si tuviesen un receptor funcional bien en homocigosis (*full/full*) como en heterocigosis (*full/del*) (Figura 26).

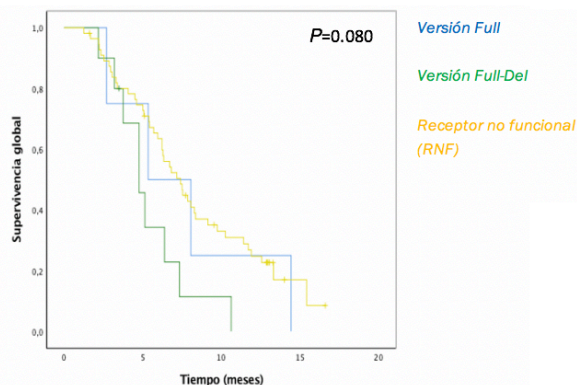


Figura 26. Análisis de supervivencia global por log-rank de los pacientes en función de las variantes alélicas de *KIR2DS4*. En la gráfica se muestra las curvas de Kaplan-Meier según el tipo de receptor KIR.

En esta ocasión obtuvimos tres grupos de supervivencia con diferencias entre ellos con una alta tendencia a la significancia ($P=0.080$) (Figura 26). Aquí observamos que aquellos pacientes que tenían la versión heterocigótica (FD, *full/del*) presentaban una mediana supervivencia global menor de 4.767 meses (rango 3.455-6.079 meses), y por tanto, un peor pronóstico comparado con la mediana de aquellos pacientes que mostraban tanto la versión completa del gen (FF, *full/full*) 5.346 meses (rango: 0.094-10.598 meses), o sin el receptor funcional (RNF) (mediana: 7.397 meses, rango: 5.973-8.822 meses). No obstante, cuando en el análisis solamente se tenían en cuenta los pacientes sin el receptor funcional (RNF) frente a aquellos pacientes heterocigotos para el gen (F/D, *full/del*) se alcanzó la significancia estadística ($P=0.025$) (Tabla 22; Figura 27).

Tabla 22. Análisis de supervivencia global en función de las variantes heterocigótica (F/D; *full/del*) o sin receptor funcional (RNF) del gen *KIR2DS4*.

	<i>Full/Del (F/D)</i>	RNF
Resumen de eventos	Total N (%)	Total N (%)
Nº de pacientes	10 (100)	56 (100)
Nº de pacientes con evento	9 (90.00)	43 (76.79)
Nº de pacientes censurados	1 (10.00)	13 (23.21)
Supervivencia Global (meses)		
Mediana (IC 95%)	4.77 (2.17, 7.33)	7.40 (5.95, 8.35)
Percentiles 25-75	3.75 – 6.38	4.60 – 11.90
Porcentaje de Supervivencia (%; IC 95%)		
0 Meses	100.00 (100.00, 100.00)	100.00 (100.00, 100.00)
3 Meses	90.00 (47.30, 98.53)	85.48 (73.06, 92.46)
6 Meses	34.29 (8.17, 63.28)	63.47 (49.27, 74.67)
9 Meses	11.43 (0.63, 39.52)	37.01 (24.32, 49.72)
12 Meses		24.75 (14.00, 37.09)
15 Meses		17.01 (6.59, 31.56)
Análisis estratificado		
P-valor (Log-rank)		0.0259
Modelo de Cox		
	Hazard ratio (IC 95%)	P
<i>full/del</i> vs. RNF	2.2710 (1.0813, 4.7698)	0.0303

N: tamaño muestral; F/D: *Full/del*; RNF: receptor no funcional; P: probabilidad

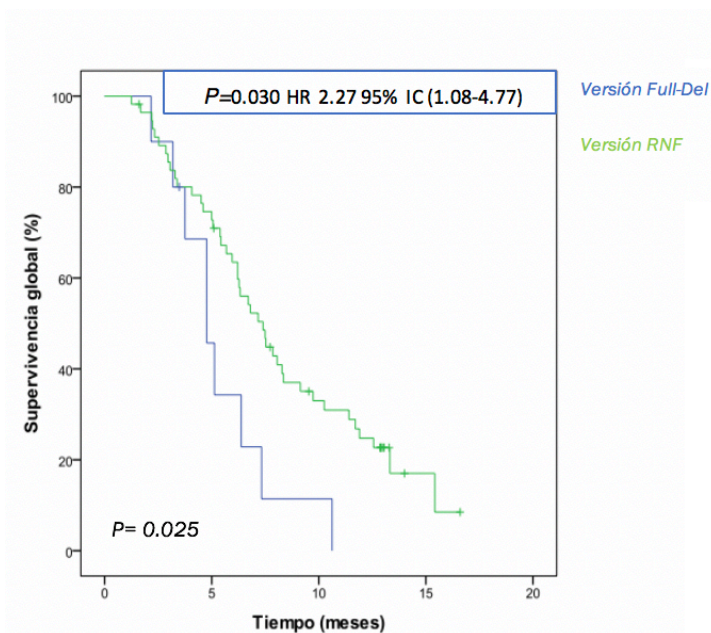


Figura 27. Análisis de supervivencia por log-rank de los pacientes en función de las variantes *Full/Del* y receptor no funcional (RNF). Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global. La caja superior derecha muestra el resultados del análisis de supervivencia por Cox.

De este análisis podemos concluir que aquellos pacientes con un receptor no funcional (RNF) se beneficiaron de 2.67 meses más de supervivencia global (mediana=7.40 meses; IC95%= 5.95-8.35 meses), frente a aquellos pacientes con la versión heterocigota del gen (mediana=4.77 meses; IC95%= 2.17-7.33) ($P=0.030$) (Tabla 22; Figura 27).

5.10.5.2 ANÁLISIS MULTIVARIANTE POR REGRESIÓN DE LOS RIESGOS PROPORCIONALES DE COX PARA LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL GEN KIR2DS4

Para comprobar el poder estadístico que presenta las variables alélicas del gen *KIR2DS4* con respecto a las demás variables clínicas con más peso estadístico respecto a la supervivencia global, llevamos a cabo un análisis multivariante de Cox. En dicho análisis incluimos el polimorfismo de interés (*KIR2DS4*) categorizado en sus variantes heterocigóticas (*Full/Del*) y sin receptor funcional (RNF), y además, incluimos como covariable la variable “número de sitios metastásicos”. El resultado de dicho análisis reveló que la variante del polimorfismo *KIR2DS4-full/del* se mantuvo significativa junto a la presencia de 3 o más metástasis. Como todos los pacientes fueron tratados con cetuximab, asumimos que los que presentaron una supervivencia mayor presentaron una mayor respuesta a cetuximab, y por lo tanto, podemos asociar la variante heterocigótica (*full/del*) como un potencial biomarcador predictivo de respuesta a cetuximab en cáncer colorrectal metastásico (Tabla 23).

Tabla 23. Análisis multivariante por regresión de Cox respecto a la supervivencia global.

	Supervivencia Global	
	P	HR (95% IC)
Número de sitios metastásicos		
2 vs. 1	0.085	2.02 (0.91-4.49)
3 o más vs. 1	0.007	3.03 (1.36-6.76)
<i>KIR2DS4 full/del vs. RNF</i>	0.045	2.17 (1.02-4.63)

P: probabilidad; HR: Hazard ratio; f/d: *full/del*

5.10.6 ESTUDIO DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL GEN KIR2DS4 EN RELACIÓN CON LA REACCIÓN CUTÁNEA DEL TRATAMIENTO.

Posteriormente, quisimos analizar el comportamiento de aquellos pacientes que presentaban reacción cutánea. Algunos autores han demostrado que aquellos pacientes que presentan este síntoma muestran mayor respuesta al tratamiento con cetuximab^{153 154 155}. Tras realizar un análisis por log rank para la supervivencia de los pacientes con reacción cutánea, pudimos comprobar dicho resultado. Aquí los pacientes afectados por dicha reacción cutánea fueron respondedores a

cetuximab por asociación con la SG (mediana= 7.492 meses; rango=6.111-8.873 meses), mientras que los que no presentaron reacción cutánea, presentaron una mediana de supervivencia de 4.504 meses (rango=2.148-6.860 meses) (Figura 28a) (Tabla 24). Los resultados con respecto al TTP también sugieren que aquellos pacientes que presentaron reacción cutánea tenían un mayor TTP mayor con una mediana de 2.597 meses (rango= 2.425-2.770 meses), frente a los que no presentaron reacción cutánea, los cuales progresaron en una mediana de 2.236 meses (rango= 1.880-2.591 meses). (Figura 28b; Tabla 25).

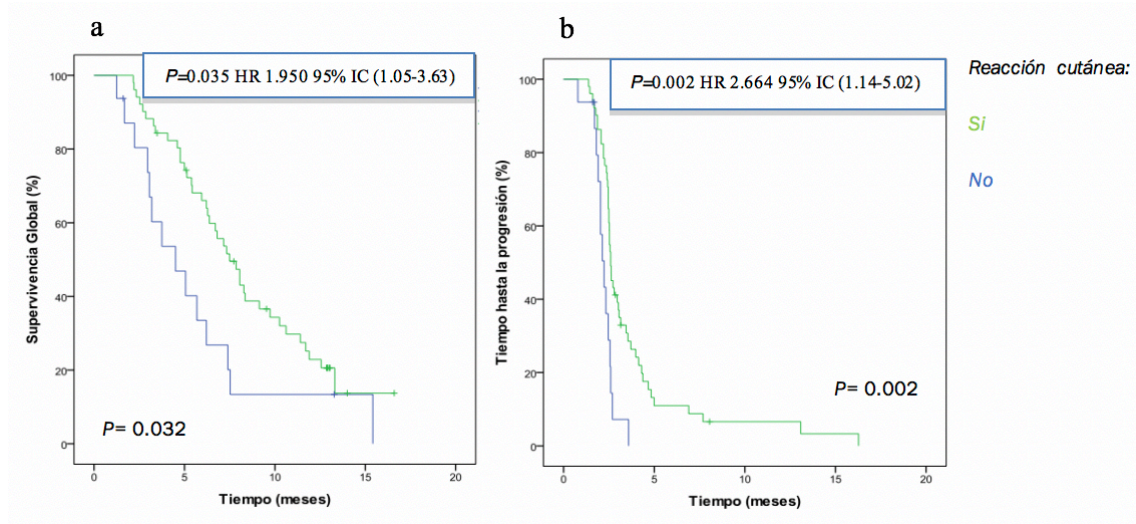


Figura 28. Análisis de supervivencia según la reacción cutánea de los pacientes tras el tratamiento con cetuximab. a) Gráfico de Kaplan-Meier para la supervivencia global. b) Gráfico de Kaplan-Meier para el tiempo hasta la progresión. HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza. La caja superior derecha muestra el resultados del análisis de supervivencia por Cox

Tabla 24. Supervivencia global de los pacientes en función de la reacción cutánea tras el tratamiento con cetuximab.

Reacción cutánea	Mediana (meses)	95% Intervalo de Confianza (meses)
Negativo	4.504	(2.148-6.860)
Positivo	7.492	(6.111-8.873)
Total	6.805	(5.499-8.112)

Tabla 25. Tiempo hasta la progresión de los pacientes en función de la reacción cutánea tras el tratamiento con cetuximab.

Reacción cutánea	Mediana (meses)	95% Intervalo de Confianza (meses)
Negativo	2.236	(1.880-2.591)
Positivo	2.597	(2.425-2.770)
Total	2.532	(2.428-2.635)

Tras confirmar que la reacción cutánea está asociada a la supervivencia, y por consiguiente, asociado a la respuesta al cetuximab, decidimos realizar un análisis de supervivencia en aquellos pacientes que eran respondedores frente al cetuximab, con la finalidad de confirmar si alguna variante alélica del gen *KIR2DS4* podía identificar algún grupo de pacientes que se beneficiasen de una mayor SG y/o TTP. Tras realizar un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mediante el test de log rank, y un posterior análisis univariante de regresión de Cox, obtuvimos que aquellos pacientes que no tenían el receptor *KIR2DS4* funcional (RNF) presentaron una mayor SG. Dato que apoya los resultados obtenidos anteriormente. Por tanto, el polimorfismo *KIR2DS4* con receptor deletado o no funcional, puede considerarse como un marcador de respuesta a cetuximab (Figura 29, Tabla 26).

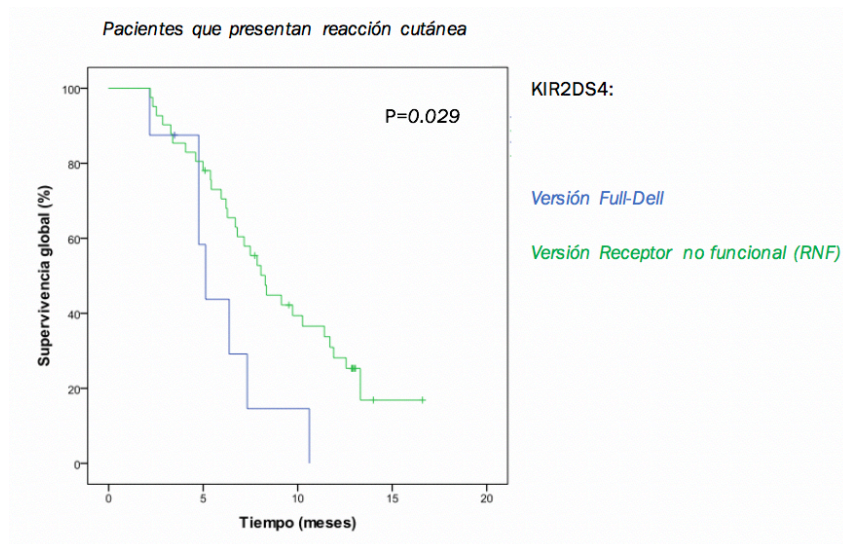


Figura 29. Análisis de supervivencia de los pacientes en función del polimorfismo *KIR2DS4* estratificados por presentar reacción cutánea. Se muestra curva de Kaplan-Meier para las distintas variantes del gen *KIR2DS4* y la significancia estadística analizada por log-rank.

Tabla 26. Datos de la mediana de supervivencia global de los pacientes con reacción cutánea en pacientes con receptor funcional del gen *KIR2DS4* para las variantes alélicas heterocigóticas (*Full/Del*) vs. pacientes sin receptor funcional (RNF).

Reacción cutánea	<i>KIR2DS4</i>	Mediana (meses)	Intervalo de confianza (meses)
Sí	<i>Full/Del</i>	5.129	(4.215-6.042)
	RNF	8.285	(7.018-9.552)
	Total	7.492	(5.863-9.122)

RNF: Receptor no funcional.

5.11 ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LA ADCC POR PARTE DEL CETUXIMAB MEDIANTE MODELOS *IN VITRO*

En primer lugar, para demostrar que el cetuximab puede activar la ADCC de las células NK y de esa manera aumentar el poder citotóxico del fármaco, co-cultivamos células NK junto a una línea celular tumoral derivada de CCRm con *KRAS* mutado. Para obtener células NK con el polimorfismo favorable *FcyRIIIa* según los criterios de inclusión del estudio clínico, se realizó una amplia selección de donantes humanos sanos para llegar a tener un mínimo de 3 muestras de células NK independientes para el desarrollo de los experimentos.

Dado que en los estudios publicados anteriormente con pacientes, las mayores diferencias de respuesta debidas al gen *KIR2DS4*, se encontraron en aquellos que tenían la versión delecionada (*Del/Del*) frente a los pacientes heterocigóticos (*Full/Del*)^{140 139}, decidimos centrar nuestros estudios de ADCC con los siguientes genotipos: *KIR2DS4d (Del/Del)* y *KIR2DS4fd (Full/Del)*.

Para este propósito, se analizó un total de 20 muestras de sangre procedentes de voluntarios sanos procedentes del Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid) para obtener un mínimo de tres muestras poblacionales independientes de células NK (n=3) con polimorfismo favorable heterocigoto para *FcyRIIIa* y con los genotipos *KIR2DS4d* y *KIR2DS4fd*.

Tras la extracción de sangre y el aislamiento de células NK de dichos pacientes seleccionados, se realizaron los co-cultivos con la línea celular humana derivada de cáncer colorrectal, LS147T. Además dicha línea celular por su mutación intrínseca en *RAS* muestra resistencia al fármaco anti-EGFR cetuximab lo que la convierte en la línea idónea para estudiar el incremento de efecto del cetuximab mediado por la ADCC.

Para ello, antes del co-cultivo de la línea LS147T con las células NK de donantes sanos, la línea celular se trató con el anticuerpo monoclonal cetuximab. Tras comprobar que la viabilidad de la línea celular no se veía afectada por el cetuximab como esperábamos ($P = \text{n.s.}$, dato no mostrado), realizamos el experimento de citotoxicidad en co-cultivo independiente con las 3 poblaciones de células NK aisladas de donantes sanos. A continuación, se procedió a la cuantificación de la respuesta al ADCC mediante la determinación de LDH en el medio de cultivo.

Para la selección de células NK positivas para el polimorfismo *FcyRIIIa*, bien homocigotos o heterocigotos para histidina en posición 131, se aisló el DNA total de las muestras de sangre periférica y se determinó con un kit de genotipado comercial (ver “Materiales y métodos”) (Figura 30).

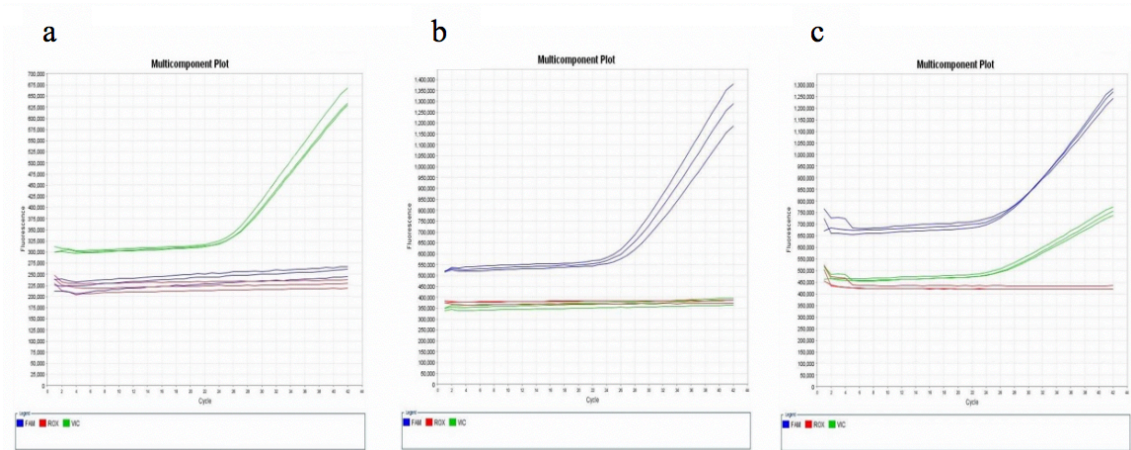


Figura 30. Imágenes representativas correspondientes a tres pacientes con distinto polimorfismo en *FcγRIIIa*: a) paciente homocigoto HH, b) paciente homocigoto RR, y c) paciente heterocigoto HR para el polimorfismo *FcγRIIIa*. En verde observamos la amplificación correspondiente al alelo marcado con la sonda Vic (His) y en azul el de la sonda Fam (Arg). En rojo tenemos el control negativo.

Posteriormente, se determinó el genotipo del gen *KIR2DS4* (*Del/Del* o *Full/Del*) en aquellos donantes sanos previamente seleccionados por ser heterocigotos u homocigotos para histidina en posición 131 del polimorfismo *FcγRIIIa* (Figura 31).

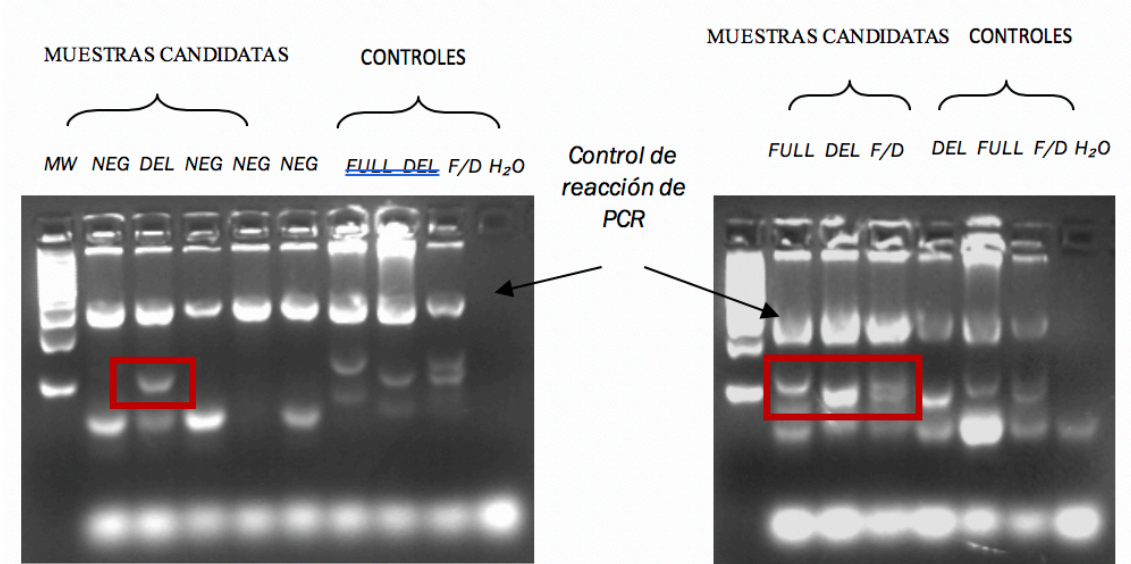


Figura 31. Imagen de los geles de agarosa al 2%, donde se puede observar los distintos genotipos correspondientes al gen *KIR2DS4*. DEL: delecionado; FULL: completo; F/D: heterocigoto (*Full/Del*); y los controles pertinentes de la técnica (H₂O, control negativo), y el control interno de amplificación (300 pb), así como marcador de peso molecular (MW).

Tras el co-cultivo y posterior tratamiento con cetuximab, se midió la ADCC a los distintos ratios 4:1, 5:1 y 6:1 (linfocitos:células tumorales). Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de citotoxicidad. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Figuras 32 y 33).

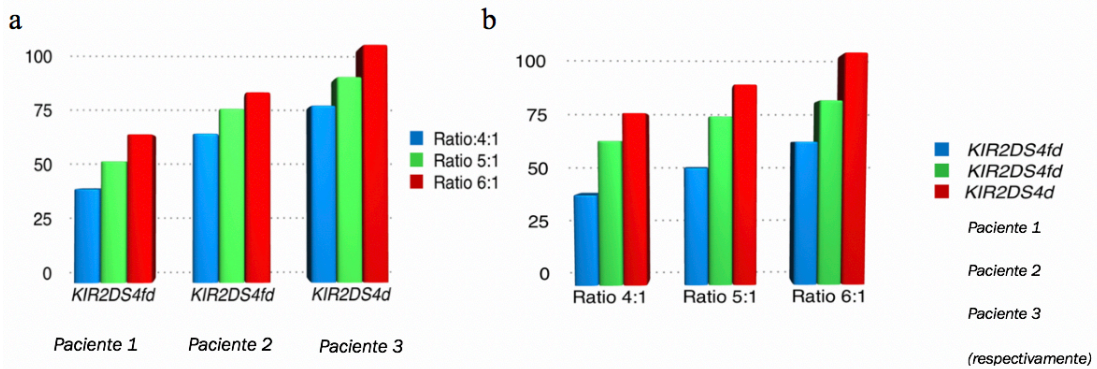


Figura 32. Respuesta ADCC por linfocitos de donantes sanos en co-cultivo con células tumorales en presencia de cetuximab. a) Representación en función del ratio linfocitos:células tumorales. b) Representación en función de los polimorfismos en el gen *KIR2DS4*. El eje de abscisas muestra el porcentaje de respuesta.

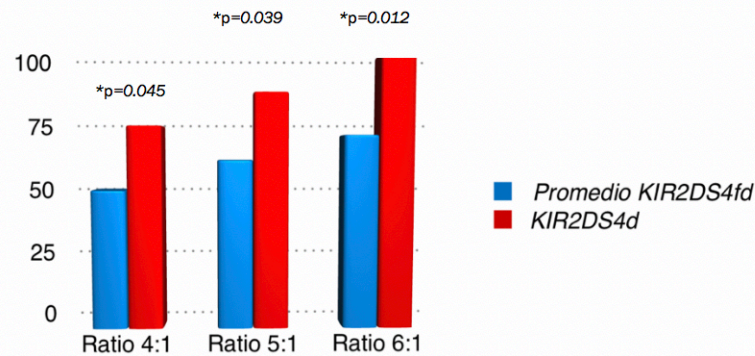


Figura 33. Respuesta a ADCC por linfocitos procedentes de donantes sanos en co-cultivo con la línea celular tumoral derivada de cáncer colorrectal LS147T en presencia de cetuximab. En azul se representa el valor promedio de los resultados procedentes de las dos muestras de células NK de donantes con la variante heterocigótica el *KIR2DS4fd* (*Full/Del*) y en rojo se muestra el resultado de las células NK con la variante delecionada del *KIR2DS4d* (*del/del*). En esta imagen observamos la comparación de la respuesta ADCC en los dos genotipos seleccionados.

Las figuras muestran que las células NK procedentes de los donantes sanos que presentaban la deleción en el gen *KIR2DS4d* ejercieron una mayor respuesta inmunitaria de ADCC frente a las células tumorales, con respecto a las células NK que presentaban la variante heterocigota del gen (*KIR2DS4fd*). Además, este resultado fue reproducible cuando se representó el promedio de los pacientes con la variante *KIR2DS4fd* con todos los ratios (linfocitos:células tumorales) que se testaron 4:1, 5:1 y 6:1 ($P=0.045$, $P=0.039$ y $P=0.012$, respectivamente) (Figura 33).

6. DISCUSIÓN

Desde que la mutación en *KRAS* se asoció significativamente con la ausencia de respuesta a cetuximab ($P=0.0003$)¹⁵⁶ la recomendación clínica para este fármaco está limitada a pacientes con *KRAS* nativo¹⁵⁷. Posteriormente, la administración se redujo no sólo a los pacientes con *KRAS* nativo, sino también a los *NRAS* nativo, lo que se denominó en conjunto como *RAS* nativo^{95 83 158}. Sin embargo, dentro de la población de *RAS* nativo, las tasas de respuesta son modestas y las duraciones de respuesta suelen ser de corta duración debido a otros efectores como son la mutación en *BRAF*, amplificación/mutación de *EGFR*, expresión de ligando de EGFR, activación de MET, HER-3 o IGF-1R^{159 160 161 162}.

Por otra parte, un meta-análisis demostró que mientras la tasa de respuesta a cetuximab en pacientes con *KRAS* nativo era del 39%, existe un 14% de pacientes con *KRAS* mutado que también presentan respuesta¹⁶³. Este hecho es muy importante a nivel clínico porque implica que un porcentaje de pacientes con *KRAS* mutado podría beneficiarse del tratamiento con cetuximab, y sin embargo, no se les está administrando según las guías oncológicas internacionales actuales⁷⁴. Esto sugiere que una activación oncogénica de la ruta metabólica del EGFR por otros efectores no justifica por completo la falta de respuesta a cetuximab. Por ello, otros mecanismos implicados en la respuesta al cetuximab podrían estar implicados, por ejemplo, la respuesta citotóxica celular mediada por anticuerpo (ADCC).

La capacidad del cetuximab para inducir la ADCC se ha observado previamente en pacientes con cáncer colorrectal metastásico (CCRm) independientemente del estado mutacional de *KRAS*¹⁶⁴. De hecho, nuestro grupo ha descrito previamente que ciertos polimorfismos en el gen que codifica para el receptor 2 de la fracción constante de las inmunoglobulinas (*FcγRIIa*) pueden desempeñar un papel en la respuesta al cetuximab en pacientes con CCRm y mutación de *KRAS*. En dicho estudio observamos que aquellos pacientes con la variante *FcγRIIa-131H/H* presentaban una tasa de respuesta a cetuximab más alta que las otras variantes (67% vs. 33% respectivamente; $P=0.017$). Además, el análisis multivariante reveló que el polimorfismo *FcγRIIa-131H/H* estaba asociado significativamente con una mayor tasa de control de la enfermedad ($P=0.008$)⁹⁹.

Sin embargo, la respuesta a ADCC no sólo se activa mediante el receptor FcγRIIa, si no también por el receptor FcγRIIIa¹²². Por ello, nos preguntamos qué polimorfismo del *FcγRIIIa* sería favorable para activar la ADCC mediada por el anticuerpo cetuximab. Entonces, diseñamos el presente estudio multicéntrico en el que reclutamos 70 pacientes con CCRm cuya muestra tumoral presentaba mutación de *KRAS*, expresión de EGFR, y el polimorfismo *FcγRIIa-131H/H* previamente descrito como favorable.

En primer lugar, analizamos la supervivencia de los pacientes en función de las variables clínico-patológicas registradas. Aquí, los estudios de supervivencia mostraron que aquellos pacientes con varios focos metastásicos (3 o más) presentaban una peor supervivencia global ($P=0.009$) y tiempo hasta la progresión más corto ($P=0.007$). Además, el órgano afectado por metástasis que peor pronóstico presentó fue el hígado, reduciendo tanto la supervivencia global ($P=0.022$), como el tiempo a la progresión ($P=0.001$). Sin embargo, la presencia exclusiva de metástasis pulmonares se asoció a mejor pronóstico, tanto en supervivencia global ($P=0.048$) como en tiempo a la progresión ($P=0.005$) frente otros lugares metastásicos. Estos resultados apoyan los encontrados por Carpizo *et al.* que encontraron una asociación estadísticamente significativa entre las metástasis hepáticas y una peor supervivencia a 3 y 5 años¹⁶⁵. Sin embargo, Elias *et al.* no encontró asociación alguna entre el pronóstico de los pacientes y el sitio metastásico, aunque sí encontró asociación con el número total de metástasis¹⁶⁶. Por lo tanto, la implicación pronóstica que tienen los distintos lugares metastásicos sigue sin ser concluyente. A pesar de ello, parece que está aceptado internacionalmente que la supervivencia de los pacientes con metástasis pulmonares exclusivamente es comparable con la de metástasis exclusivamente hepáticas (aunque superior en el caso de metástasis pulmonares¹⁶⁷). Lo que sí está demostrado es que el pronóstico es mucho peor en los pacientes con metástasis ósea, peritoneal o cerebral^{168 169 170}.

Posteriormente, estudiamos la implicación de la variante del receptor FcγRIIIa en la supervivencia de los pacientes con CCRm y KRAS mutado. Sin embargo, el análisis de supervivencia de Cox no mostró ventaja alguna entre la variante FcγRIIIa-V158F y las demás variantes estudiadas (V158V, F158F) ni en supervivencia global ($P=0.864$), ni en tiempo a la progresión ($P=0.363$). Este resultado está de acuerdo con una publicación anterior realizada con una cohorte similar de pacientes ($n=96$) con CCRm refractario con mutación de KRAS¹²⁴. Sin embargo, otros estudios han demostrado lo contrario. En 2007, Zhang *et al.* describió que el polimorfismo en FcγRIIIa-V158F estaba asociado (aunque sin alcanzar la significancia estadística) con la supervivencia libre de progresión en pacientes con CCRm con independencia del estado mutacional de KRAS de los pacientes ($P=0.055$)¹⁶⁴. Posteriormente en 2009, el grupo de Bibeau *et al.* describió que sí había un polimorfismo de FcγRIIIa asociado a una mayor supervivencia para los pacientes con CCRm y KRAS mutado. Sin embargo, tanto la supervivencia ($P=0.039$) como la tasa de respuesta ($P=0.052$) fue mayor en aquellos pacientes con la variante FcγRIIIa-V158V que en los pacientes con la variante V158F¹²². Por consiguiente, el papel de este polimorfismo FcγRIIIa-V158F sigue sin estar claro y serán necesarios otros estudios con tamaños muestrales mayores para asociar el papel de este polimorfismo a la tasa de respuesta al cetuximab y al pronóstico de los pacientes con CCRm y KRAS mutado.

Por otra parte, en el presente ensayo clínico también evaluamos el valor pronóstico de las distintas variantes de los genes KIR en los pacientes tratados con cetuximab. Decidimos estudiar los genes

KIR ya que, por una parte son receptores de superficie que controlan la función efectora de las células NK, y por otro lado, pensamos que podría activar la respuesta ADCC dada la estrecha relación entre las células NK y la ADCC¹³¹.

En nuestro estudio evaluamos el valor pronóstico de los siguientes genes KIR: *KIR2DL2*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR3DS1*, y *KIR3DP1*. Aunque ninguno de ellos se asoció ni a la supervivencia global ni al tiempo a la progresión de los pacientes reclutados, el gen *KIR2DS4* mostró una alta tendencia hacia la significancia con respecto a la supervivencia global ($P=0.071$). Este resultado nos hizo pensar que quizás había algún polimorfismo en el mismo gen que podría explicar dicha tendencia, por lo que cuantificamos en los pacientes las cuatro variantes alélicas del gen *KIR2DS4*: la homocigótica para variante completa (*Full/Full*, *FF*), la homocigótica para variante delecionada (*Del/Del*, *DD*), la heterocigótica (*Full/Del*, *fd*), y la ausencia de la variante (*Null*). Puesto que las variantes delecionada (*Del/Del*, *DD*) y la ausencia de la variante (*Null*) daban como resultado un receptor no funcional (*KIR2DS4-RNF*) decidimos agrupar estas dos variantes. Por otro lado, las variantes *Full/Full* y *Full/Del*, presentaban al menos una copia completa y dan lugar a receptores funcionales. Finalmente, realizamos los análisis con los dos grupos mayoritarios en los que uno de ellos eran los pacientes con receptor no funcional “RNF” (agrupación de pacientes *Null* y pacientes *Del/Del*, *DD*); y el otro grupo estaba formado por los pacientes con el genotipo heterocigoto (*Full/Del*, *fd*). A continuación, decidimos comparar la supervivencia global entre las variantes *KIR2DS4fd* y la *KIR2DS4-RNF* y observamos que la variante *KIR2DS4fd* presentaba un peor pronóstico comparada con la variante *KIR2DS4-RNF* ($P=0.030$). Además, la significancia estadística para supervivencia global de ambas variantes se mantuvo tras el análisis multivariante junto a la covariante “número de sitios metastásicos” ($P=0.045$). De este análisis podemos concluir que la variante *KIR2DS4fd* está asociada con peor pronóstico en los pacientes con CCRm, mutación de *KRAS*, con polimorfismo *FcγRIIIa-131H/H* y que fueron tratados con cetuximab.

En la última década, se han descrito varios genes KIR, la expresión de seis de ellos activan la célula NK (*KIR2DS1-5* y *KIR3DS1*), y siete son inhibidores de su función (*KIR2DL1-3*, *KIR3DL1-3* y *KIR2DL5*)¹⁷¹. Poco se sabe sobre la función de la variante completa (*Full*, *f*) del gen que codifica para el receptor KIR2DS4 en cuanto al pronóstico o como factor predictivo de respuesta a tratamientos biológicos en CCRm. Un estudio previo asoció la variante *KIR2DS4f* con la patogénesis del VIH¹³⁹. Aquí los autores sugirieron que las células NK positivas para la variante completa del (*KIR2DS4f*) podrían tener una mayor y duradera actividad celular ante la infección crónica por VIH-1. También apoyaron que la activación inmune crónica durante la infección por VIH-1 podría inducir respuestas de IFN- γ , lo que podría explicar la transmisión acelerada del VIH-1 asociada a la variante *KIR2DS4f*. Además, la correlación positiva entre la expresión de la variante *KIR2DS4f* y la carga viral de VIH-1, sugiere que dicha variante podría contribuir a un

ambiente pro-inflamatorio durante la infección por VIH-1, promoviendo su patogénesis¹³⁹. En otro estudio, se describe que la respuesta al tratamiento con metotrexato de los pacientes con artritis reumatoide podría depender de la presencia de la variante *KIR2DS4f*¹⁴⁰. Además, la expresión del gen *KIR2DS4f* en un subconjunto de linfocitos T podría ser responsable de una forma grave de artritis reumatoide resistente a quimioterapia¹⁴⁰.

Sin embargo, debido al bajo tamaño muestral de *KIR2DS4f* (n=4) que hemos obtenido en nuestra población muestral de estudio, no podemos concluir ni aportar conclusiones concluyentes relativas a esta variante alélica del gen.

Aproximadamente, el 25% de la población mundial no presenta una variante funcional *KIR2DS4-RNF*¹³⁷. La variante delecionada (*Del, d*) del gen *KIR2DS4* codifica una proteína truncada con una deleción de 22 pb en el exón 5. Por lo tanto, carece de los dominios transmembrana y citoplasmático, y resulta en una variante soluble de la proteína que no se puede anclar a la membrana citoplasmática y es conocida como receptor no funcional (RNF)¹³⁷. Sin embargo, el papel de esta proteína soluble sigue sin estar claro. Se postula que su función podría ser como un “señuelo” para absorber el HLA soluble y así interferir con la función de las células NK, o unirse a un ligando alternativo^{132 172}.

En nuestro estudio observamos un incremento en la supervivencia en nuestra cohorte de pacientes que presentaron el receptor KIR no funcional (*KIR2DS4-RNF*). Esto sugiere un nuevo papel de la variante del *KIR2DS4-RNF* como biomarcador predictivo de respuesta a cetuximab. Nuestro resultado va en concordancia con otro estudio realizado con 224 pacientes con CCRm tratados en primera línea con 5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecán (FOLFIRI), pero no con terapias biológicas. Aquí observaron que la ausencia de *KIR2DS4* se asoció con una mayor tasa de respuesta patológica completa a dicho tratamiento ($P=0.001$)¹⁷³.

Aunque nuestro ensayo clínico se ha llevado a cabo de forma multicéntrica, una de las limitaciones de nuestro estudio es que se ha realizado con un tamaño muestral escaso. Por lo tanto, para elucidar si la firma genética basada en los polimorfismos en *FcγRIIIa* y en *KIR2DS4* podría ser un potencial biomarcador para la predicción de respuesta a cetuximab en pacientes con CCRm, mutación de *KRAS* y expresión de EGFR, necesitamos reclutar una serie de validación independiente.

Sin embargo, hemos complementado nuestro estudio con una validación *in vitro* donde hemos evaluado la capacidad del cetuximab para activar la ADCC de las células NK de donantes sanos con los polimorfismos favorables. En los estudios publicados anteriormente con pacientes, las mayores diferencias de respuesta debidas al gen *KIR2DS4*, se encontraron en aquellos que tenían la versión delecionada (*Del/Del*), frente a los pacientes heterocigotos (*fd; Full/Del*)^{140 139}. Por consiguiente, decidimos centrar nuestros estudios de ADCC con los siguientes genotipos del gen *KIR2DS4*: *KIR2DS4d (Del/Del)* (grupo correspondiente a pacientes con “receptor no funcional”

(RNF)) y *KIR2DS4fd* (*Full/Del*). Para conseguir al menos tres replicas del experimento con los polimorfismos favorables *FcγRIIIa-131* (*H/H* o *H/R*) y con *KIR2DS4* (*Del/Del* o *Full/Del*), fueron necesarias 20 muestras de donantes sanos de los que se aisló población NK. Posteriormente, las células NK se cultivaron individualmente en presencia de la línea celular derivada de CCR con mutación de *KRAS*, LS147T, para aproximar a máximo el modelo a las condiciones de los pacientes. Interesantemente, los resultados obtenidos con este modelo *in vitro* apoyaron los resultados encontrados en nuestra cohorte de pacientes. Por lo tanto, los genotipos favorables con *FcγRIIIa-131* (*H/H* ó *H/R*) y *KIR2DS4* (*Del/Del*, *d*) están asociados a una mayor respuesta a cetuximab debido a la activación de la ADCC en pacientes con mutación de *KRAS*. Aunque, serían necesarios experimentos complementarios con otras líneas celulares humanas derivadas de CCR con mutación de *KRAS* para llevar a cabo un buen análisis estadístico de los resultados. Aun así, este ensayo *in vitro* complementa y apoya los resultados llevados a cabo por un modelo *in vivo* con xenoinjertos de líneas celulares derivadas de CCR en ratones *Athymic Nude*¹⁷⁴. Otros autores encontraron que la activación de la ADCC por el cetuximab estaba asociado a la expresión del EGFR ($P < 0.05$), pero no con el estado mutacional de *KRAS/BRAF* ($P > 0.5$), en una población asiática de CCR¹⁷⁵. De cualquier modo, son necesarios más ensayos de validación para confirmar nuestros resultados.

En conclusión, nuestro estudio sugiere que el uso del polimorfismo *FcγRIIIa-131* (*H/H* ó *H/R*) y la presencia del polimorfismo *KIR2DS4d* podría ser de gran utilidad para identificar aquellos pacientes con CCRm, *KRAS* mutado y expresión de EGFR, que podrían beneficiarse del tratamiento con cetuximab. Esto podría mejorar las esquemas de tratamiento actuales disponibles para estos pacientes; ya que, el cetuximab sólo se administra en pacientes con *KRAS* nativo. La incorporación de estos polimorfismos podría ampliar el espectro de tratamiento a otros pacientes con *KRAS* mutado. Además, estos resultados apoyan el papel del cetuximab en la activación de la ADCC tal y como se ha publicado en otros tipos de cáncer como pulmón¹⁷⁶ o cabeza y cuello¹⁷⁷. Por otra parte, estos resultados ofrecen una explicación racional a la variabilidad en la respuesta del fármaco en pacientes con CCRm y *KRAS* mutado.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral con la cohorte de pacientes de CCRm positivos para la mutación de *KRAS*, expresión de EGFR y del polimorfismo *FcγRIIIa-131H/H* apoyan las siguientes conclusiones:

- La presencia de tres o más metástasis es un factor asociado a mal pronóstico relativo tanto a la supervivencia libre de progresión como a la supervivencia global .
- Las metástasis hepáticas limitan significativamente tanto la supervivencia libre de progresión como la supervivencia global por encima de las metástasis localizadas en otros órganos.
- Ninguna de las variantes génicas en el *FcγRIIIa-158* (*V158F*, *V158V* o *F158F*) presenta asociación ni con la supervivencia global, ni con el tiempo a la progresión.
- El único gen de la familia de los *KIR* que mostró una alta tendencia a la significancia con respecto a la supervivencia global fue el gen *KIR2DS4*.
- Tras estudiar las variantes del gen *KIR2DS4*, aquellas que codificaban para un receptor no funcional, fueron aquellas que presentaban una significativamente mayor supervivencia global.
- La variante delecionada del gen *KIR2DS4* (*KIR2DS4del*) ofrece una mayor respuesta a cetuximab a través de la activación *in vitro* de la ADCC.
- Según nuestros resultados, un porcentaje de pacientes con CCRm y *KRAS* mutado podría beneficiarse del tratamiento con cetuximab siempre que presente el polimorfismo *FcγRIIIa-131H/H* y la variante *KIR2DS4del*.
- La activación oncogénica de la ruta metabólica del EGFR/MAPK por otros efectores no justifica por completo la falta de respuesta a cetuximab.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer*. 2015;136(5):E359-86. doi:10.1002/ijc.29210
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912
4. Observatorio del Cáncer de la AECC- Incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal en España en la población entre 50 y 69 años. Marzo 2018. <https://www.aecc.es/sites/default/files/content-file/Informe-incidencia-colon.pdf>.
5. Steel E, Robbins A, Jenkins M, Flander L, Gaff C, Keogh L. How does genetic risk information for Lynch syndrome translate to risk management behaviours? *Hered Cancer Clin Pract*. 2017;15:1. doi:10.1186/s13053-016-0061-6
6. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med*. 2016;14:21. doi:10.1186/s12967-016-0772-5
7. Ueno H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, et al. Objective criteria for crohn-like lymphoid reaction in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(4):434-441. doi:10.1309/AJCPWHUEFTGBWKE4
8. Khalili H, Gong J, Brenner H, et al. Identification of a common variant with potential pleiotropic effect on risk of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2015;36(9):999-1007. doi:10.1093/carcin/bgv086
9. Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clin Colorectal Cancer*. 2016;15(1):67-73. doi:10.1016/j.clcc.2015.07.004
10. Moiel D, Thompson J. Early detection of colon cancer-the kaiser permanente northwest 30-year history: how do we measure success? Is it the test, the number of tests, the stage, or the percentage of screen-detected patients? *Perm J*. 2011;15(4):30-38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319413>.
11. Langevin JM, Nivatvongs S. The true incidence of synchronous cancer of the large bowel. A prospective study. *Am J Surg*. 1984;147(3):330-333. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6703204>.
12. Passman MA, Pommier RF, Vetto JT. Synchronous colon primaries have the same prognosis as solitary colon cancers. *Dis Colon Rectum*. 1996;39(3):329-334. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603557>.
13. Mulder SA, Kranse R, Damhuis RA, et al. Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer: a Dutch population-based study. *Cancer Epidemiol*. 2011;35(5):442-447. doi:10.1016/j.canep.2010.12.007

14. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology*. 1997;112(2):594-642.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024315>.
15. Chen F, Stuart M. Colonoscopic follow-up of colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1994;37(6):568-572. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8200236>.
16. Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):6786-6808.
[doi:10.3748/wjg.v20.i22.6786](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6786)
17. Adler J, Robertson DJ. Interval Colorectal Cancer After Colonoscopy: Exploring Explanations and Solutions. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(12):1657-64; quiz 1665. [doi:10.1038/ajg.2015.365](https://doi.org/10.1038/ajg.2015.365)
18. Adrián-de-Ganzo Z, Alarcón-Fernández O, Ramos L, et al. Uptake of Colon Capsule Endoscopy vs Colonoscopy for Screening Relatives of Patients With Colorectal Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(13):2293-301.e1. [doi:10.1016/j.cgh.2015.06.032](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.06.032)
19. Romero-Vázquez J, Caunedo-Álvarez Á, Belda-Cuesta A, Jiménez-García VA, Pellicer-Bautista F, Herrerías-Gutiérrez JM. Extracolonic findings with the PillCam Colon: is panendoscopy with capsule endoscopy closer? *Endosc Int open*. 2016;4(10):E1045-E1051. [doi:10.1055/s-0042-115406](https://doi.org/10.1055/s-0042-115406)
20. Macdonald JS. Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. *Semin Oncol*. 1999;26(5):556-560. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10528904>.
21. Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(33):5313-5327.
[doi:10.1200/JCO.2006.08.2644](https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.2644)
22. Palmqvist R, Engarås B, Lindmark G, et al. Prediagnostic levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 in colorectal cancer: a matched case-control study. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(11):1538-1544. [doi:10.1097/01.DCR.0000089121.59268.D2](https://doi.org/10.1097/01.DCR.0000089121.59268.D2)
23. van der Schouw YT, Verbeek AL, Wobbes T, Segers MF, Thomas CM. Comparison of four serum tumour markers in the diagnosis of colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 1992;66(1):148-154.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379057>.
24. Liu Z, Zhang Y, Niu Y, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLoS One*. 2014;9(8):e103910.
[doi:10.1371/journal.pone.0103910](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103910)
25. Alexander JC, Silverman NA, Chretien PB. Effect of age and cigarette smoking on carcinoembryonic antigen levels. *JAMA*. 1976;235(18):1975-1979.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/56468>.
26. Sajid KM, Parveen R, Durr-e-Sabih, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in hookah smokers, cigarette smokers and non-smokers. *J Pak Med Assoc*. 2007;57(12):595-599.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173042>.
27. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003;39(6):718-727. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651195>.

28. Edge SB, Compton CC. *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-1474. doi:10.1245/s10434-010-0985-4
29. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2016*. *CA Cancer J Clin*. 66(1):7-30. doi:10.3322/caac.21332
30. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. *Impact of screening colonoscopy on outcomes in colon cancer surgery*. *JAMA Surg*. 2013;148(8):747-754. doi:10.1001/jamasurg.2013.8
31. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. *Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience*. *Cancer*. 1986;57(9):1866-1870. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3485470>.
32. Griffin MR, Bergstralh EJ, Coffey RJ, Beart RW, Melton LJ. *Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum*. *Cancer*. 1987;60(9):2318-2324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3440238>.
33. Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, et al. *The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer. Findings from the NSABP clinical trials*. *Ann Surg*. 1983;198(6):743-752. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6357118>.
34. Carraro PG, Segala M, Cesana BM TG. *Obstructing colonic cancer: failure and survival patterns over a ten-year follow-up after one-stage curative surgery*. *Dis Colon Rectum*. 2001;44:243.
35. Crucitti F, Sofo L, Doglietto GB, et al. *Prognostic factors in colorectal cancer: current status and new trends*. *J Surg Oncol Suppl*. 1991;2:76-82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1892535>.
36. Stapley S, Peters TJ, Sharp D, Hamilton W. *The mortality of colorectal cancer in relation to the initial symptom at presentation to primary care and to the duration of symptoms: a cohort study using medical records*. *Br J Cancer*. 2006;95(10):1321-1325. doi:10.1038/sj.bjc.6603439
37. Caldarella A, Crocetti E, Messerini L, Paci E. *Trends in colorectal incidence by anatomic subsite from 1985 to 2005: a population-based study*. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28(5):637-641. doi:10.1007/s00384-013-1672-2
38. Price TJ, Beeke C, Ullah S, et al. *Does the primary site of colorectal cancer impact outcomes for patients with metastatic disease?* *Cancer*. 2015;121(6):830-835. doi:10.1002/ncr.29129
39. Loupakis F, Yang D, Yau L, et al. *Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer*. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(3). doi:10.1093/jnci/dju427
40. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. *Patterns of metastasis in colon and rectal cancer*. *Sci Rep*. 2016;6:29765. doi:10.1038/srep29765
41. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-532. doi:10.1056/NEJM198809013190901
42. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, et al. *Allelotype of colorectal carcinomas*. *Science*. 1989;244(4901):207-211. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2565047>.
43. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, et al. *Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma [corrected]*. *JAMA*. 1989;261(21):3099-3103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2654431>.

44. *Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Acta Oncol. 2014;53(7):852-864. doi:10.3109/0284186X.2014.895036*
45. *Alliot C. Relevance of EGFR expression in colorectal cancer. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2005;16(9):1557-8; author reply 1558-9. doi:10.1093/annonc/mdi261*
46. *Sahin IH, Oktay AA. EGFR signalling and oncogenic pathway signature in colorectal cancer. Gut. 2013;62(11):1670. doi:10.1136/gutjnl-2013-304781*
47. *Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med. 2008;358(11):1160-1174. doi:10.1056/NEJMra0707704*
48. *Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N Engl J Med. 2007;357(20):2040-2048. doi:10.1056/NEJMoa071834*
49. *Clarke CN, Kopetz ES. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. J Gastrointest Oncol. 2015;6(6):660-667. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.077*
50. *Aranda E, Aparicio J, Alonso V, et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer 2015. Clin Transl Oncol. 2015;17(12):972-981. doi:10.1007/s12094-015-1434-4*
51. *Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2015;26(1):13-21. doi:10.1093/annonc/mdl378*
52. *Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. J Natl Cancer Inst. 2014;106(7). doi:10.1093/jnci/dju106*
53. *Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. Gastroenterology. 2015;148(1):88-99. doi:10.1053/j.gastro.2014.09.041*
54. *Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. Cancer Res. 2005;65(14):6063-6069. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0404*
55. *Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. J Natl Cancer Inst. 2013;105(15):1151-1156. doi:10.1093/jnci/djt173*
56. *Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. J Clin Oncol. 2010;28(3):466-474. doi:10.1200/JCO.2009.23.3452*
57. *Fariña-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Moerland E, et al. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2010;21(12):2396-2402. doi:10.1093/annonc/mdq258*

58. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5931-5937. doi:10.1200/JCO.2009.22.4295
59. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *Br J Cancer*. 2001;85(5):692-696. doi:10.1054/bjoc.2001.1964
60. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. *College of American Pathologists Consensus Statement 1999*. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):979-994. doi:10.1043/0003-9985(2000)124<0979:PFICC>2.0.CO;2
61. Green JB, Timmcke AE, Mitchell WT, Hicks TC, Gathright JB, Ray JE. Mucinous carcinoma--just another colon cancer? *Dis Colon Rectum*. 1993;36(1):49-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380140>.
62. Secco GB, Fardelli R, Campora E, et al. Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology*. 51(1):30-34. doi:10.1159/000227306
63. Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A, Chaffey JT. Colloid carcinoma of the colon and rectum. *Cancer*. 1987;60(12):3103-3112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2824024>.
64. Minsky BD. Clinicopathologic impact of colloid in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1990;33(8):714-719. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2165455>.
65. Frizelle FA, Hobday KS, Batts KP, Nelson H. Adenosquamous and squamous carcinoma of the colon and upper rectum: a clinical and histopathologic study. *Dis Colon Rectum*. 2001;44(3):341-346. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289278>.
66. Jass JR SL, Jass JR, Sobin LH. Histological typing of intestinal tumours. In: *WHO International Histological Classification of Tumours, 2nd*, Springer-Verlag, Berlin-New York 1989.
67. Klein CA. Framework models of tumor dormancy from patient-derived observations. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(1):42-49. doi:10.1016/j.gde.2010.10.011
68. Courtney D, McDermott F, Heeney A, Winter DC. Clinical review: surgical management of locally advanced and recurrent colorectal cancer. *Langenbeck's Arch Surg*. 2014;399(1):33-40. doi:10.1007/s00423-013-1134-x
69. West NP, Quirke P. Colon cancer surgery: pathological quality control is essential for optimal outcomes. *Colorectal Dis*. 2018;20 Suppl 1:34-35. doi:10.1111/codi.14075
70. Tamas K, Walenkamp AME, de Vries EGE, et al. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(8):671-679. doi:10.1016/j.ctrv.2015.06.007
71. Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*. 2002;94(9):2511-2516. doi:10.1002/cncr.10492
72. Grávalos C, García-Escobar I, García-Alfonso P, Cassinello J, Malón D, Carrato A. Adjuvant chemotherapy for stages II, III and IV of colon cancer. *Clin Transl Oncol*. 2009;11(8):526-533. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661027>.
73. Hameed H, Cassidy J. Use of capecitabine in management of early colon cancer. *Cancer Manag Res*. 2011;3:295-299. doi:10.2147/CMR.S12704
74. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group.

- Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2014;25 Suppl 3:iii1-9.
doi:10.1093/annonc/mdu260
75. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. Lancet (London, England). 2008;371(9617):1007-1016. doi:10.1016/S0140-6736(08)60455-9
 76. Gruenberger B, Tamandl D, Schueller J, et al. Bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008;26(11):1830-1835. doi:10.1200/JCO.2007.13.7679
 77. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, et al. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. Lancet Oncol. 2010;11(1):38-47. doi:10.1016/S1470-2045(09)70330-4
 78. Ye L-C, Liu T-S, Ren L, et al. Randomized controlled trial of cetuximab plus chemotherapy for patients with KRAS wild-type unresectable colorectal liver-limited metastases. J Clin Oncol. 2013;31(16):1931-1938. doi:10.1200/JCO.2012.44.8308
 79. Cirocchi R, Trastulli S, Abraha I, et al. Non-resection versus resection for an asymptomatic primary tumour in patients with unresectable stage IV colorectal cancer. Cochrane database Syst Rev. 2012;(8):CD008997. doi:10.1002/14651858.CD008997.pub2
 80. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2004;350(23):2335-2342. doi:10.1056/NEJMoa032691
 81. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. J Clin Oncol. 2008;26(12):2013-2019. doi:10.1200/JCO.2007.14.9930
 82. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2014;371(17):1609-1618. doi:10.1056/NEJMoa1403108
 83. Van Cutsem E, Lenz H-J, Köhne C-H, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2015;33(7):692-700. doi:10.1200/JCO.2014.59.4812
 84. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N Engl J Med. 2013;369(11):1023-1034. doi:10.1056/NEJMoa1305275
 85. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nor. J Clin Oncol. 2007;25(13):1670-1676. doi:10.1200/JCO.2006.09.0928
 86. Sastre J, Grávalos C, Rivera F, et al. First-line cetuximab plus capecitabine in elderly patients with advanced colorectal cancer: clinical outcome and subgroup analysis according to KRAS status from a Spanish TTD Group Study. Oncologist. 2012;17(3):339-345.

- doi:10.1634/theoncologist.2011-0406
87. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(11):1077-1085. doi:10.1016/S1470-2045(13)70154-2
 88. Ducreux M, Malka D, Mendiboure J, et al. Sequential versus combination chemotherapy for the treatment of advanced colorectal cancer (FFCD 2000-05): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2011;12(11):1032-1044. doi:10.1016/S1470-2045(11)70199-1
 89. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med.* 2001;345(9):638-646. doi:10.1056/NEJMoa010580
 90. Hofheinz R-D, Wenz F, Post S, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(6):579-588. doi:10.1016/S1470-2045(12)70116-X
 91. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(17):1731-1740. doi:10.1056/NEJMoa040694
 92. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol.* 2004;22(7):1201-1208. doi:10.1200/JCO.2004.10.182
 93. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3499-3506. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201
 94. Li J, Qin S, Xu R, et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):619-629. doi:10.1016/S1470-2045(15)70156-7
 95. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2016;27(8):1386-1422. doi:10.1093/annonc/mdw235
 96. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(10):1626-1634. doi:10.1200/JCO.2007.14.7116
 97. Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(6):563-572. doi:10.1056/NEJMoa0808268
 98. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, et al. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):672-680. doi:10.1200/JCO.2008.19.8135
 99. Rodríguez J, Zarate R, Bandres E, et al. Fc gamma receptor polymorphisms as predictive markers of Cetuximab efficacy in epidermal growth factor receptor downstream-mutated

- metastatic colorectal cancer*. *Eur J Cancer*. 2012;48(12):1774-1780.
doi:10.1016/j.ejca.2012.01.007
100. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-1964.
doi:10.1126/science.1129139
101. Koelzer VH, Dawson H, Andersson E, et al. Active immunosurveillance in the tumor microenvironment of colorectal cancer is associated with low frequency tumor budding and improved outcome. *Transl Res*. 2015;166(2):207-217. doi:10.1016/j.trsl.2015.02.008
102. Ogino S, Galon J, Fuchs CS, Dranoff G. Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(12):711-719.
doi:10.1038/nrclinonc.2011.122
103. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5944-5951.
doi:10.1200/JCO.2008.19.6147
104. Broussard EK, Disis ML. TNM staging in colorectal cancer: T is for T cell and M is for memory. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):601-603. doi:10.1200/JCO.2010.32.9078
105. Monteverde M, Milano G, Strola G, et al. The relevance of ADCC for EGFR targeting: A review of the literature and a clinically-applicable method of assessment in patients. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;95(2):179-190. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.02.014
106. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2015;6:368.
doi:10.3389/fimmu.2015.00368
107. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-49. doi:10.1126/science.1198687
108. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008;27(45):5932-5943. doi:10.1038/onc.2008.267
109. Lanier LL. A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis. *Nat Med*. 2001;7(11):1178-1180. doi:10.1038/nm1101-1178
110. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(11):850-861. doi:10.1038/nrc928
111. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(1):7-19. doi:10.1038/nrc.2015.5
112. Anegón I, Cuturi MC, Trinchieri G, Perussia B. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med*. 1988;167(2):452-472.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2831292>.
113. Shore SL, Nahmias AJ, Starr SE, Wood PA, McFarlin DE. Detection of cell-dependent cytotoxic antibody to cells infected with herpes simplex virus. *Nature*. 1974;251(5473):350-352.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4372535>.
114. László A, Petri I, Ilyés M. Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)-reaction and an in

- vitro steroid sensitivity test of peripheral lymphocytes in children with malignant haematological and autoimmune diseases. Acta Paediatr Hung. 1986;27(1):23-29.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3730180>.
115. Natsume A, Niwa R, Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther. 2009;3:7-16.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19920917>.
116. Albertini MR, Hank JA, Sondel PM. Native and genetically engineered anti-disialoganglioside monoclonal antibody treatment of melanoma. *Cancer Chemother Biol Response Modif. 2005;22:789-797.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110641>.
117. García-Foncillas J, Díaz-Rubio E. Progress in metastatic colorectal cancer: growing role of cetuximab to optimize clinical outcome. *Clin Transl Oncol. 2010;12(8):533-542.*
 doi:10.1007/s12094-010-0551-3
118. Garnock-Jones KP, Keating GM, Scott LJ. Trastuzumab: A review of its use as adjuvant treatment in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive early breast cancer. *Drugs. 2010;70(2):215-239.* doi:10.2165/11203700-000000000-00000
119. Navid F, Santana VM, Barfield RC. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr Cancer Drug Targets. 2010;10(2):200-209.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20201786>.
120. Winter MC, Hancock BW. Ten years of rituximab in NHL. *Expert Opin Drug Saf. 2009;8(2):223-235.* doi:10.1517/14740330902750114
121. Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY. Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug Discov Today. 2007;12(21-22):898-910.* doi:10.1016/j.drudis.2007.08.009
122. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, et al. Impact of Fc γ RIIIa-Fc γ RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol. 2009;27(7):1122-1129.*
 doi:10.1200/JCO.2008.18.0463
123. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc γ RIIIa gene. *Blood. 2002;99(3):754-758.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806974>.
124. Paez D, Paré L, Espinosa I, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy? *Cancer Sci. 2010;101(9):2048-2053.* doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01621.x
125. Kjersem JB, Skovlund E, Ikdahl T, et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms and clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line 5-fluorouracil/folinic acid and oxaliplatin +/- cetuximab. *BMC Cancer. 2014;14:340.* doi:10.1186/1471-2407-14-340
126. Vogelpoel LTC, Baeten DLP, de Jong EC, den Dunnen J. Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front Immunol. 2015;6:79.* doi:10.3389/fimmu.2015.00079
127. Vilches C, Gardiner CM, Parham P. Gene structure and promoter variation of expressed and

- nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene.* J Immunol. 2000;165(11):6416-6421.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086080>.
128. Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. Science. 1995;268(5209):405-408.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7716543>.
129. D'Andrea A, Chang C, Franz-Bacon K, McClanahan T, Phillips JH, Lanier LL. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. J Immunol. 1995;155(5):2306-2310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650366>.
130. Le Dréan E, Vély F, Olcese L, et al. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. Eur J Immunol. 1998;28(1):264-276. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<264::AID-IMMU264>3.0.CO;2-O
131. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. Annu Rev Immunol. 2002;20:217-251. doi:10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942
132. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. Tissue Antigens. 2002;60(3):254-258.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445308>.
133. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(9):4778-4783.
doi:10.1073/pnas.080588597
134. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. Immunity. 1997;7(6):739-751.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430220>.
135. Chan H-W, Kurago ZB, Stewart CA, et al. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. J Exp Med. 2003;197(2):245-255.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538663>.
136. Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. Tissue Antigens. 2000;56(4):313-326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11098931>.
137. Middleton D, Gonzalez A, Gilmore PM. Studies on the expression of the deleted KIR2DS4*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and nondeleted versions in different populations. Hum Immunol. 2007;68(2):128-134. doi:10.1016/j.humimm.2006.12.007
138. Ureshino H, Shindo T, Kojima H, et al. Allelic Polymorphisms of KIRs and HLAs Predict Favorable Responses to Tyrosine Kinase Inhibitors in CML. Cancer Immunol Res. 2018;6(6):745-754. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0462
139. Merino AM, Dugast A-S, Wilson CM, et al. KIR2DS4 promotes HIV-1 pathogenesis: new evidence from analyses of immunogenetic data and natural killer cell function. PLoS One. 2014;9(6):e99353. doi:10.1371/journal.pone.0099353
140. Majorczyk E, Pawlik A, Gendosz D, Kuśnierczyk P. Presence of the full-length KIR2DS4 gene

- reduces the chance of rheumatoid arthritis patients to respond to methotrexate treatment.* BMC Musculoskelet Disord. 2014;15:256. doi:10.1186/1471-2474-15-256
141. Ordóñez D, Moraru M, Gómez-Lozano N, Cisneros E, Vilches C. KIR typing by non-sequencing methods: polymerase-chain reaction with sequence-specific primers. Methods Mol Biol. 2012;882:415-430. doi:10.1007/978-1-61779-842-9_24
142. Vilches C, Castaño J, Gómez-Lozano N, Estefanía E. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. Tissue Antigens. 2007;70(5):415-422. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00923.x
143. Correale P, Marra M, Remondo C, et al. Cytotoxic drugs up-regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in colon cancer cells and enhance their susceptibility to EGFR-targeted antibody-dependent cell-mediated-cytotoxicity (ADCC). Eur J Cancer. 2010;46(9):1703-1711. doi:10.1016/j.ejca.2010.03.005
144. Herter S, Birk MC, Klein C, Gerdes C, Umana P, Bacac M. Glycoengineering of Therapeutic Antibodies Enhances Monocyte/Macrophage-Mediated Phagocytosis and Cytotoxicity. J Immunol. 2014;192(5):2252-2260. doi:10.4049/jimmunol.1301249
145. Tada M, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Kawasaki N. Development of a cell-based assay measuring the activation of FcγRIIIa for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. PLoS One. 2014;9(4):e95787. doi:10.1371/journal.pone.0095787
146. Perussia B, Loza MJ. Assays for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and reverse ADCC (redirected cytotoxicity) in human natural killer cells. Methods Mol Biol. 2000;121:179-192. doi:10.1385/1-59259-044-6:179
147. Nakadate Y, Kodera Y, Kitamura Y, et al. KRAS mutation confers resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against human colorectal cancer cells. Int J cancer. 2014;134(9):2146-2155. doi:10.1002/ijc.28550
148. Broussas M, Broyer L, Goetsch L. Evaluation of antibody-dependent cell cytotoxicity using lactate dehydrogenase (LDH) measurement. Methods Mol Biol. 2013;988:305-317. doi:10.1007/978-1-62703-327-5_19
149. Bar J, Spencer S, Morgan S, et al. Correlation of lactate dehydrogenase isoenzyme profile with outcome in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy and bevacizumab or cediranib: Retrospective analysis of the HORIZON I study. Clin Colorectal Cancer. 2014;13(1):46-53. doi:10.1016/j.clcc.2013.11.002
150. Wang W, Li Y, Zhang X, et al. Evaluating the significance of expression of CEA mRNA and levels of CEA and its related proteins in colorectal cancer patients. J Surg Oncol. 2014;109(5):440-444. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24783267>.
151. Bossard C, Bézieau S, Matysiak-Budnik T, et al. HLA-E/β2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. Int J cancer. 2012;131(4):855-863. doi:10.1002/ijc.26453
152. Pan N, Jiang W, Sun H, et al. KIR and HLA loci are associated with hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B virus infection: a case-control study. PLoS One. 2011;6(10):e25682. doi:10.1371/journal.pone.0025682

153. Jaka A, Gutiérrez-Rivera A, Ormaechea N, et al. Association between EGFR gene polymorphisms, skin rash and response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Exp Dermatol.* 2014;23(10):751-753. doi:10.1111/exd.12510
154. Petrelli F, Borgonovo K, Barni S. The predictive role of skin rash with cetuximab and panitumumab in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis of published trials. *Target Oncol.* 2013;8(3):173-181. doi:10.1007/s11523-013-0257-x
155. Abdel-Rahman O, Fouad M. Correlation of cetuximab-induced skin rash and outcomes of solid tumor patients treated with cetuximab: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;93(2):127-135. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.07.005
156. Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006;66(8):3992-3995. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0191
157. García-Alfonso P, Salazar R, García-Foncillas J, et al. Guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma (CRC): a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol.* 2012;14(10):726-739. doi:10.1007/s12094-012-0856-5
158. Bokemeyer C, Köhne C-H, Ciardiello F, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2015;51(10):1243-1252. doi:10.1016/j.ejca.2015.04.007
159. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):753-762. doi:10.1016/S1470-2045(10)70130-3
160. Scartozzi M, Giampieri R, Maccaroni E, et al. Analysis of HER-3, insulin growth factor-1, nuclear factor-kB and epidermal growth factor receptor gene copy number in the prediction of clinical outcome for K-RAS wild-type colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2012;23(7):1706-1712. doi:10.1093/annonc/mdr558
161. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med.* 2012;18(2):221-223. doi:10.1038/nm.2609
162. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2013;3(6):658-673. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0558
163. Qiu L-X, Mao C, Zhang J, et al. Predictive and prognostic value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: a meta-analysis of 22 studies. *Eur J Cancer.* 2010;46(15):2781-2787. doi:10.1016/j.ejca.2010.05.022
164. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol.* 2007;25(24):3712-3718. doi:10.1200/JCO.2006.08.8021

165. *Carpizo DR, Are C, Jarnagin W, et al. Liver resection for metastatic colorectal cancer in patients with concurrent extrahepatic disease: results in 127 patients treated at a single center. Ann Surg Oncol. 2009;16(8):2138-2146. doi:10.1245/s10434-009-0521-6*
166. *Elias D, Liberale G, Vernerey D, et al. Hepatic and extrahepatic colorectal metastases: when resectable, their localization does not matter, but their total number has a prognostic effect. Ann Surg Oncol. 2005;12(11):900-909. doi:10.1245/ASO.2005.01.010*
167. *Prasanna T, Karapetis CS, Roder D, et al. The survival outcome of patients with metastatic colorectal cancer based on the site of metastases and the impact of molecular markers and site of primary cancer on metastatic pattern. Acta Oncol. July 2018:1-7. doi:10.1080/0284186X.2018.1487581*
168. *Nozue M, Oshiro Y, Kurata M, et al. Treatment and prognosis in colorectal cancer patients with bone metastasis. Oncol Rep. 9(1):109-112. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748466.*
169. *Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJG, Bleichrodt RP. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. Ann Surg. 2006;243(2):212-222. doi:10.1097/01.sla.0000197702.46394.16*
170. *Damiens K, Ayoub JPM, Lemieux B, et al. Clinical features and course of brain metastases in colorectal cancer: an experience from a single institution. Curr Oncol. 2012;19(5):254-258. doi:10.3747/co.19.1048*
171. *Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance. KIR and their role in disease. Mol Interv. 2005;5(4):226-240. doi:10.1124/mi.5.4.6*
172. *Katz G, Gazit R, Arnon TI, et al. MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. J Immunol. 2004;173(3):1819-1825. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265913.*
173. *De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, et al. Genetic diversity of the KIR/HLA system and outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy. PLoS One. 2014;9(1):e84940. doi:10.1371/journal.pone.0084940*
174. *Chen S, Li X, Chen R, Yin M, Zheng Q. Cetuximab intensifies the ADCC activity of adoptive NK cells in a nude mouse colorectal cancer xenograft model. Oncol Lett. 2016;12(3):1868-1876. doi:10.3892/ol.2016.4835*
175. *Seo Y, Ishii Y, Ochiai H, et al. Cetuximab-mediated ADCC activity is correlated with the cell surface expression level of EGFR but not with the KRAS/BRAF mutational status in colorectal cancer. Oncol Rep. 2014;31(5):2115-2122. doi:10.3892/or.2014.3077*
176. *Kol A, Terwisscha van Scheltinga A, Pool M, Gerdes C, de Vries E, de Jong S. ADCC responses and blocking of EGFR-mediated signaling and cell growth by combining the anti-EGFR antibodies imgatuzumab and cetuximab in NSCLC cells. Oncotarget. 2017;8(28):45432-45446. doi:10.18632/oncotarget.17139*
177. *Lattanzio L, Denaro N, Vivenza D, et al. Elevated basal antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and high epidermal growth factor receptor (EGFR) expression predict favourable outcome in patients with locally advanced head and neck cancer treated with cetuximab and radiotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2017;66(5):573-579. doi:10.1007/s00262-017-1960-8*