



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Descripción de biomarcadores diagnósticos
en formas de alto riesgo de cáncer colorrectal
y desarrollo de un modelo *in vitro* para la evaluación
de la respuesta a terapias dirigidas contra
el microambiente tumoral**

Gerhard Jung

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

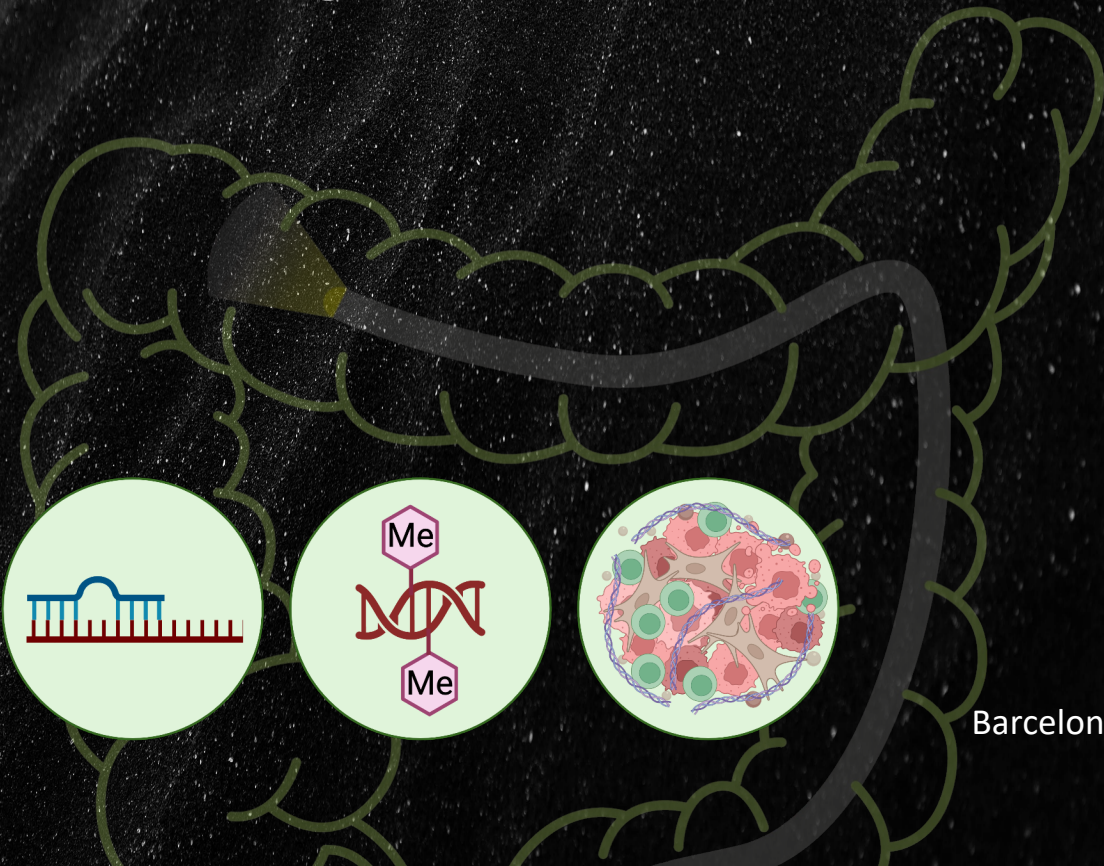


UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESIS DOCTORAL

Descripción de biomarcadores diagnósticos en formas de alto riesgo de cáncer colorrectal y desarrollo de un modelo *in vitro* para la evaluación de la respuesta a terapias dirigidas contra el microambiente tumoral

Gerhard Jung



Barcelona, 2023

El coraje de la verdad
es la primera condición
del estudio filosófico.

— G. F. W. Hegel



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
· Campus Clínic ·

Título de la Tesis Doctoral

Descripción de biomarcadores diagnósticos en formas de alto riesgo de cáncer colorrectal y desarrollo de un modelo *in vitro* para la evaluación de la respuesta a terapias dirigidas contra el microambiente tumoral

Memoria de tesis doctoral presentada por **Gerhard Jung** para optar el grado de doctor por la Universitat de Barcelona

Directores Dr. Francesc Balaguer i Prunés^{1,2}
Dr. Eduard Batlle Gómez³
Tutor Dr. Antoni Castells i Garangou^{1,2}

Programa de Doctorado: Medicina i Recerca Translacional

Línea de Investigación:

Fisiopatología de las Enfermedades Médico-Quirúrgicas

Grupo de Investigación: Cáncer Digestivo

Investigadores Principales:

Dra. María Pellisé Urquiza^{1,2}, Dr. Francesc Balaguer i Prunés^{1,2}, Dr. Eduard Batlle Gómez³

Barcelona, abril 2023

Filiaciones:

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Grupo de Oncología Gastrointestinal y Pancreática (OGiP)

²Hospital Clínic de Barcelona, Instituto de Enfermedades Digestivas y Metabólicas, Departamento de Gastroenterología

³Institute of Research in Biomedicine Barcelona (IRB), Cancer Science Program, Colorectal Cancer Laboratory



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Las normas de la presentación de la tesis doctoral de la Universitat de Barcelona contemplan que es opcional añadir una página de agradecimientos. Para mí, no obstante, esta página no es en absoluto un mero ejercicio ‘opcional’ de dar las gracias a todos aquellos y aquellas que me han apoyado en la realización de este trabajo, sino supone una parte esencial, y quizá la más importante, de todo el manuscrito. Expresar la profunda gratitud que he sentido durante los últimos cuatro años no solo debe reconocer a toda la gente que ha contribuido en mayor o menor medida al éxito de esta tesis, sino también sirve para fortalecer mi propia humildad, ya que sin ayuda externa no habría sido posible. Si bien una cierta dosis de competición sana puede ser el motor de nuevos avances, estoy profundamente convencido que los grandes logros de la humanidad se consiguen mediante la colaboración. De hecho, esta misma tesis es fruto de colaboración de tres instituciones de investigación catalanas con renombre internacional y me siento privilegiado de haber tenido la oportunidad de aprender y trabajar en ellas: el Hospital Clínic, el IDIBPAS y el IRB Barcelona. Y con este espíritu colaborativo y humilde quiero dar las gracias:

Ante todos, a Francesc Balaguer, mi mentor y uno de los dos directores de la tesis, por motivarme a ella y darme la oportunidad de reiniciarme en el mundo de la investigación traslacional. Eres mi ídolo. No solo porque te considero un excelente profesional clínico y brillante investigador sino también porque eres una persona abierta, cercana y cariñosa. Creo que existen pocos jefes que consiguen con tanta facilidad generar un ambiente en el que da gusto dar el máximo de uno mismo. Gracias por aceptarme como soy, por creer en mí e integrarme en tu equipo, por tus palabras motivadoras en los momentos difíciles y por ayudarme a crecer.

A Eduard Batlle, el segundo director de la tesis, por acogerme en su laboratorio y enseñarme el fascinante mundo de la investigación básica. Honestamente, le tenía mucho respeto a este mundo – por no decir miedo, pero muy pronto este fue disipado por el gran apoyo que recibí por tu parte y por todo tu equipo. Tu pasión por el cáncer colorrectal es ejemplar y muy inspirador. Ha sido un gran honor poder aprender de los mejores del mundo en este campo.

A María Pellisé, investigadora principal de uno de los proyectos de la tesis, a quien tengo especial cariño. Aún recuerdo el primer día que te conocí: apenas había empezado a hacer endoscopias cuando coincidimos por primera vez en un box. Tu habilidad para resear pólipos y tus conocimientos eran tan impresionantes que pensé: persigue a esta doctora porque de ella vas a aprender mucho. Mi admiración solo pudo crecer al ver el peso que tenías en la endoscopia nacional y europea. Gracias por compartir tu sabiduría y tu acceso a la red de colaboradores que sin ella este proyecto no habría sido posible.

A Antoni Castells, mi tutor y probablemente la persona más resolutiva y eficiente que conozco. El excelente funcionamiento de tu grupo de investigación – el OGiP hizo que se pudieron ejecutar los proyectos de esta tesis en tiempo récord. Mil gracias también por

asumir la tutoría. Solucionaste cada cosa que te pedí casi al instante, lo cual es aún más impresionante sabiendo las múltiples funciones que tienes como director médico del prestigioso Hospital Clínic.

Siguiendo con el OGiP del IDIBPS y el Hospital Clínic quiero dar las gracias a todos los profesionales médicos, biólogos, de enfermería, técnicos y administrativos implicados en los proyectos. Especial mención merecen, sin duda alguna, Isabel Quintanilla, primera coautora del primer artículo y Eva Hernández-Illán, coautora del segundo, así como Mireya Jimeno y Jénifer Muñoz, todas del IDIBAPS, por su ayuda en la planificación y ejecución de los experimentos. Juan José Lozano, bioestadístico y bioinformático, es otro protagonista sin él que hubiera sido imposible traer conclusiones de la inmensa cantidad de datos que generamos.

También quiero agradecerle a Josep Llach, jefe de la Unidad de Endoscopia Digestiva del Hospital Clínic, por hacer posible la obtención de una multitud de muestras endoscópicas. Por otro lado, a Míriam Cuatrecasas, anatomopatóloga y una eminencia en la patología digestiva, por su ayuda en el procesamiento, la gestión y la evaluación de las muestras endoscópicas y quirúrgicas. Mil gracias también por tu tiempo y las clases particulares que me diste al empezar los proyectos.

Otra persona del Clínic a quien quiero expresar mi especial gratitud es Leticia “Lety” Moreira. No voy a olvidar nunca el cariño con el que me recibiste el primer día que aterricé en la CAR ni tampoco tu escucha activa y tus palabras motivadoras en los momentos de frustración cuando los experimentos ‘no salían’ como yo quisiera. Mil gracias también a los demás miembros de la CAR por incontables conversas inspiradoras tanto profesionales como personales. Sois un equipo excepcional y entrañable al que ya estoy echando de menos: Sabela Carballal, Liseth Rivero, Ariadna Sánchez, Teresa Ocaña, Lorena Moreno, Oswaldo Ortiz y Joan Llach. Por otro lado, agradecer al equipo de ‘Enfermedades Inflammatorias’, Julià Panés, Elena Ricart e Ingrid Ordás, también unas eminencias en su campo, por su ayuda con las muestras del primer proyecto y la revisión del manuscrito.

Hablando de muestras, no hay que olvidar que la tesis tampoco habría sido posible sin la contribución de muestras y la colaboración de otros hospitales entre los que destacan: el Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia (Luis Bujanda), el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (María Isabel Vera), el Hospital Universitario de las Islas Canarias (Enrique Quintero, Marta Carrillo Palau y Goretti Hernández), el Hospital General Universitario de Alicante (Rodrigo Jover) y el Beckman Research Institute, California (Ajay Goel y Yasuyuki Okada).

Y ahora el grupo de Cáncer Colorrectal del IRB: os admiro por la enorme implicación y el esfuerzo que invertís en sembrar los fundamentos para futuras terapias. ¡Sois imprescindibles para el avance de la sociedad! Recuerdo incontables horas compartidas dentro de los muros del IRB Barcelona, fines de semana y festivos incluidos, trabajando juntos sin perder nunca el

buen rollo y la pasión por la ‘causa’. En particular, quiero dar las gracias a Elena Sancho por ayudarme con todo lo administrativo, incluida la revisión de las memorias y la tesis. También te agradezco tu tiempo por las clases particulares para enseñarme los ensayos TOP/FOP. Por otro lado, Carme Cortina y Maria Salvany, quienes me enseñaron los fundamentos de trabajo en un laboratorio biomédico – desde cultivos celulares, organoides, PCR hasta citometría de flujo y microscopía avanzada. Mil gracias por compartir vuestros conocimientos y por vuestra paciencia, ya que tuve que aprender todo desde cero. También Xavier Hernando, uno de los veterinarios del grupo, muchas gracias por enseñarme cómo manejar los animales y por tu ayuda con las operaciones. Nunca olvidaré las conversas interesantes que tuvimos en el estabulario. Marta Sevillano, la técnica del laboratorio, también merece una especial mención, porque sin ella no habría sido posible gestionar tantas – casi incontables, muestras y tinciones.

En este punto también quiero dar las gracias a todas las personas que trabajan en otros Servicios y que también fueron imprescindibles para la realización de la tesis: el biobanco del IDIBPAS, el estabulario del IRB, el Servicio de Histopatología del IRB (especial gracias a Neus Prats, Mónica Aguilera, Alicia Ferrer y Anais Mallen) y el Servicio de Microscopía Digital Avanzada del IRB (especial gracias a Julien Colombelli, Lúdia Bardia y Anna Lladó).

No quiero olvidarme de dar las gracias a todas las personas que también son esenciales en el día a día de un investigador, pero suelen ser menos visibles. En particular, a Irene Garrido, administrativa del Servicio de Gastroenterología: gracias por tu disponibilidad y ayudar con cualquier asunto sea pequeño o grande. Y a Chus Curiel, gracias por ayudarme con muchas gestiones, dudas y preguntas con la beca ‘PhD4MD’. Además, a todas las personas que no menciono, pero que de alguna u otra forma también han contribuido.

Esta sección no sería completa sin agradecerles a los pacientes que consintieron participar en los estudios y ceder sus muestras a la investigación, aunque no obtuvieran ningún beneficio directo de ello. ¡Gracias por vuestro compromiso para que futuras generaciones de pacientes puedan tener una atención médica mejor! Por último, también hay que estar agradecido por las múltiples vidas que dejaron los ratones sacrificados. Continuar desarrollando los modelos *in vitro* usados en la presente tesis debe servir en el futuro para reducir la cantidad y necesidad de experimentos animales *in vivo*.

Para acabar, me siento inmensamente afortunado y feliz por los amigos y la familia que tengo, ante todo el amor de mi vida, Eduard Klein, por su comprensión y apoyo durante estos años ‘durillos’ y los muchos ‘NOS’ que han tenido que aceptar.

¡Muchas Gracias, Moltes Gràcies, thank you very much, Vielen Dank!

FINANCIACIÓN

FINANCIACIÓN

Los proyectos de esta tesis doctoral fueron financiados por las siguientes ayudas:

BECAS PERSONALES DEL DOCTORANDO:

1. Premi Fi de Residència “**Emili Letang**”, otorgado por el Hospital Clínic de Barcelona.
2. “**PhD4MD**”, beca predoctoral de colaboración entre el grupo de Oncología Gastrointestinal y Pancreática (OGiP) del Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) de Barcelona y el Grupo de Cáncer Colorrectal del Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona), otorgada por la Generalitat de Catalunya, Departament de Salut (PERIS 2019-2021), resolución **SLT/3104/2018**.

AYUDAS A LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN:

El proyecto “MicroARNs como biomarcadores para la progresión neoplásica en la colitis ulcerosa” fue financiado por:

1. Dos becas del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII): **PI12/01481** y **PI19/01050**; investigadora principal: Dra. María Pellisé Urquiza. La beca PI19/01050 estaba cofinanciada por la Unión Europea. CIBEREHD está financiado por el Instituto de Salud Carlos III y la beca Marató de TV3 (201932-30).
2. Partes de este trabajo también fueron financiadas por la Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya patrocinada por el Pla Director d’Oncologia de Catalunya (XBTC).

El proyecto “Análisis del defecto de campo mediado por metilación aberrante del ADN en el síndrome de poliposis serrada” fue financiado por:

3. Dos becas del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII): **PI16/00766** y **PI19/01867**; investigador principal: Dr. Francesc Balaguer i Prunés. Ambas becas fueron cofinanciadas por la Unión Europea a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER): “Una manera de hacer Europa” y el Fondo Social Europeo (FSE): “El FSE invierte en tu futuro”.
4. Partes de este proyecto también recibieron ayudas de la Asociación Española de Gastroenterología (AEG), y
5. Ayudas del National Cancer Institute, National Institute of Health, Estados Unidos: CA72851, CA184792, CA187956, y CA202797.

Ninguna de las partes financiadoras ha estado involucrada en la recopilación, análisis e interpretación de los datos.



Generalitat de Catalunya
Departament de Salut



Instituto de Salud Carlos III



**NATIONAL
CANCER
INSTITUTE**



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	11
FINANCIACIÓN.....	17
ÍNDICE	21
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	23
GLOSARIO.....	27
ARTÍCULOS	31
SUMMARY.....	35
1. INTRODUCCIÓN	41
1.1. Epidemiología del Cáncer Colorrectal.....	41
1.1.1. Incidencia, Mortalidad y Supervivencia.....	41
1.1.2. Etiología.....	44
1.2. Fisiopatología del Cáncer Colorrectal	51
1.2.1. Consideraciones Generales	51
1.2.2. La Vía Clásica: Adenoma → Carcinoma.....	54
1.2.3. La Vía Serrada: Lesión Serrada → Carcinoma	55
1.2.4. La Vía Inflamatoria: Inflamación → Displasia → Carcinoma.....	59
1.3. Estrategias de Prevención del Cáncer Colorrectal	67
1.3.1. Generalidades sobre la Prevención en el CCR.....	67
1.3.2. Vigilancia en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal	70
1.3.3. Vigilancia en el Síndrome de Poliposis Serrada.....	74
1.4. El Microambiente Tumoral del Cáncer Colorrectal.....	81
1.4.1. El Rol del MAT para la Iniciación, Progresión y Metástasis	81
1.4.2. El MAT como Diana Terapéutica	88
1.5. Nuevos Tratamientos del Cáncer Colorrectal.....	92
1.5.1. Introducción	92
1.5.2. Tratamientos dirigidos al Microambiente Tumoral.....	93
1.5.3. Predicción de la Respuesta Terapéutica.....	97
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS & OBJETIVOS.....	105
2.1. Justificación General de la Tesis	105
2.2. Las Hipótesis de la Tesis	106
2.3. Los Objetivos Generales y Específicos de la Tesis.....	106
3. MATERIAL, MÉTODOS & RESULTADOS	111
3.1. Resultados del Primer Proyecto	111

3.2. Resultados del Segundo Proyecto	124
3.3. Resultados del Tercer Proyecto	139
3.3.1. Generación de Metástasis Hepáticas de Cáncer Colorrectal	139
3.3.2. Generación de los Organoides de Segunda Generación (ALIO)	142
3.3.3. Caracterización de los ALIOs	146
3.3.4. El Efecto de la Inmunoterapia sobre los ALIOs	149
3.3.5. Cultivos Organotípicos.....	161
3.4. Material & Métodos del Tercer Proyecto	163
3.4.1. Aspectos éticos.....	163
3.4.2. Ratones modificados genéticamente.....	163
3.4.3. Cultivos de organoides derivados de ratones (MTOs)	164
3.4.4. Generación de metástasis hepáticas en ratones.....	164
3.4.5. Generación de organoides de segunda generación en interfaz aire-líquido (ALIO).....	165
3.4.6. Producción de medio condicionado por WNT, Noggin y R-Spondin 1 (WNR).....	166
3.4.7. Generación de cultivos organotípicos (COT)	166
3.4.8. Bioluminiscencia.....	167
3.4.9. Histopatología, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.....	167
3.4.10. Microscopia confocal	169
3.4.11. Citometría de flujo	170
3.4.12. Análisis de expresión	171
4. DISCUSIÓN.....	181
4.1. Discusión del Primer Proyecto.....	181
4.2. Discusión del Segundo Proyecto.....	184
4.3. Discusión del Tercer Proyecto	187
4.3.1. Discusión del Modelo	189
4.3.2. Viabilidad y Caracterización de los ALIOs y COTs	190
4.3.3. Respuesta a los Tratamientos	192
4.3.4. Valoración Global de los Modelos y Futuras Direcciones.....	194
5. CONCLUSIONES.....	199
6. BIBLIOGRAFÍA.....	205

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras	Página
Figura 1 Epidemiología del Cáncer Colorrectal (I)	42
Figura 2 Epidemiología del Cáncer Colorrectal (II)	43
Figura 3 Proporción aproximada de los subtipos de CCR	45
Figura 4 Imagen endoscópica de las lesiones serradas	50
Figura 5 Imagen histológica de las lesiones serradas	51
Figura 6 Cripta colónica normal	52
Figura 7 Evolución del cáncer	53
Figura 8 La vía clásica del CCR	55
Figura 9 La vía serrada del CCR	56
Figura 10 La vía inflamatoria del CCR	60
Figura 11 Histología de las lesiones asociadas a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal	61
Figura 12 Imagen endoscópica de la displasia asociada a la EII	61
Figura 13 Biogénesis y mecanismos de acción de los microARNs	65
Figura 14 Prevención del CCR asociado a la EII (simplificado) y estratificación del riesgo para los intervalos del cribado mediante pancromoendoscopia	72
Figura 15 Definición antigua y actual del Síndrome de Poliposis Serrada	75
Figura 16 Manejo del SPS y FPG con SPS según la guía de la ESGE (2019)	78
Figura 17 Rasgos distintivos del cáncer	81
Figura 18 El Ciclo de inmunidad contra el cáncer	86
Figura 19 Esquema de un cultivo de organoides con interfaz aire-líquido (ALIO) (arriba) y de un cultivo organotípico (COT) (abajo)	101
Figura 20 Crecimiento de MTOs (Mouse Tumor Organoids)	140
Figura 21 Generación de metástasis hepáticas	141
Figura 22 Infiltración linfocítica de las metástasis hepáticas al día 14	142
Figura 23 Esquema de la generación de cultivos ALIO	144
Figura 24 Optimización de las condiciones de cultivo	145
Figura 25 Caracterización histológica de tres fenotipos diferentes de metástasis hepáticas y de tres ALIOs reminiscentes de las metástasis	147
Figura 26 Caracterización Histológica de los ALIO al día 4 y al día 7 de su cultivo	148
Figura 27 Efectos de la inmunoterapia sobre los ALIOs <i>in vitro</i> (I)	150
Figura 28 Efectos de la inmunoterapia sobre los ALIOs <i>in vitro</i> (II)	151
Figura 29 Efectos de la inmunoterapia sobre los ALIOs <i>in vitro</i> (III)	152
Figura 30 Efectos de la inmunoterapia sobre ALIOs provenientes de ratones atímicos	153
Figura 31 Escalada de dosis de la inmunoterapia en ALIOs	154
Figura 32 Efectos de la inmunoterapia en ratones <i>in vivo</i>	155
Figura 33 Respuesta en ALIOs derivados de metástasis grandes vs. pequeñas	156
Figura 34 Efectos de la triple inmunoterapia (adición de tratamiento dirigido a los macrófagos)	158
Figura 35 Efectos de la triple inmunoterapia (adición de tratamiento dirigido a los macrófagos) medidos mediante citometría de flujo	159
Figura 36 Marcadores de activación linfocítica en los ALIOs	160

Figura 37	Cultivos Organotípicos	161
Figura 38	Efecto de la inmunoterapia sobre los Cultivos Organotípicos	162

Tablas

Tabla 1	Síndromes con Alto Riesgo de Cáncer Colorrectal	46
Tabla 2	Recomendaciones de la AEG (2018) y ESGE (2019) sobre el Cribado y la Vigilancia del CCR esporádico y los Síndromes de Alto Riesgo	69
Tabla 3	Tabla de recursos y fungibles	173

GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALIO	Air-liquid interface organoid (organoide en interfaz aire-líquido)
ARN / ARNm	Ácido ribonucleico / Ácido ribonucleico mensajero
BLI	Bioluminescence Imaging (bioluminiscencia en imágenes)
AST	Adenoma serrado tradicional
CAF	Cancer associated fibroblast (fibroblasto asociado al cáncer)
CCR	Cáncer colorrectal
CCR-CU	Cáncer colorrectal asociado a la colitis ulcerosa
CCR-EII	Cáncer colorrectal asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal
CCRm	Cáncer colorrectal metastásico
CIMP	CpG island methylator phenotype (fenotipo metilador de islas CpG)
COT	Cultivo organotípico
CSC	Cancer stem cell (célula madre cancerígena)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico)
CU	Colitis ulcerosa
DAG	Displasia de alto grado
DBG	Displasia de bajo grado
DMC	Differentially Methylated CpG (CpG diferencialmente metilado)
DMR	Differentially Methylated Region (región diferencialmente metilada)
EC	Enfermedad de Crohn
EEM	Error estándar de la media
EGF	Epidermal growth factor (factor de crecimiento epidérmico)
EGF-R	Receptor del EGF
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EMA	European Medicines Agency (Agencia Europea de los Medicamentos)

FDA	U.S. Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos)
FPG	Familiar de primer grado
GPC	Guía de práctica clínica
HLA	Human leucocyte antigen (antígeno leucocitario humano)
IPCI	Inhibidor de los puntos de control inmunitario
LS	Lesión serrada
LSS	Lesión serrada sésil
MAT	Microambiente tumoral
microARN	micro ácido ribonucleico
MMRd	Mismatch repair deficient (sistema de reparación de emparejamientos erróneos deficiente)
MMRp	Mismatch repair proficient (sistema de reparación de emparejamientos erróneos competente)
MSI	Microsatellite instability (inestabilidad de microsatélites)
MSS	Microsatellite stability (estabilidad de microsatélites)
MTO	Mouse Tumor Organoid (organoide derivado de ratón)
PD-1	Programmed cell death protein 1 (proteína 1 de muerte celular programada)
PD-L1	Programmed Death-ligand 1 (ligando 1 de muerte programada)
PH	Pólipo hiperplásico
PS	Pólipo serrado
SPS	Síndrome de poliposis serrada
TAM	Tumor associated macrophage (macrófago asociado al tumor)
TCR	T cell receptor (receptor de la célula T)
TGF-β	Transforming growth factor beta (factor de crecimiento transformante beta)
Treg	Célula T reguladora
VEGF	Vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento vascular endotelial)

ARTÍCULOS

Tesis en formato de compendio de artículos.

La tesis consta de tres objetivos principales. Dos de ellos han sido publicados en los siguientes dos artículos:

1. Primer objetivo: identificar y validar biomarcadores tipo microARN en tejido para la progresión neoplásica en la colitis ulcerosa:

Quintanilla I*, **Jung G***, Jimeno M, Lozano JJ, Sidorova J, Camps J, Carballal S, Bujanda L, Vera MI, Quintero E, Carrillo-Palau M, Cuatrecasas M, Castells A, Panés J, Ricart E, Moreira L, Balaguer F, Pellisé M. Differentially Deregulated MicroRNAs as Novel Biomarkers for Neoplastic Progression in Ulcerative Colitis. Clin Transl Gastroenterol. 2022 Jul 1;13(7):e00489. Epub 2022 Apr 8.

*Isabel Quintanilla y Gerhard Jung contribuyeron igualmente a este trabajo.

Factor de impacto (JCR): 4.396 (2021), segundo cuartil (42/93) en el área de conocimiento 'Gastroenterology & Hepatology'.

2. Segundo objetivo: describir el fenómeno de hipermetilación del ADN en mucosa normal de pacientes con síndrome de poliposis serrada:

Jung G, Hernández-Illán E, Lozano JJ, Sidorova J, Muñoz J, Okada Y, Quintero E, Hernandez G, Jover R, Carballal S, Cuatrecasas M, Moreno L, Diaz M, Ocaña T, Sánchez A, Rivero L, Ortiz O, Llach J, Castells A, Pellisé M, Goel A, Batlle E, Balaguer F. Epigenome-Wide DNA Methylation Profiling of Normal Mucosa Reveals HLA-F Hypermethylation as a Biomarker Candidate for Serrated Polyposis Syndrome. J Mol Diagnostics. 2022 Jun;24(6):674-686. Epub 2022 Apr 18.

Factor de impacto (JCR): 5.341 (2021), primer cuartil (18/77) en el área de conocimiento 'Pathology'.

SUMMARY

SUMMARY

Colorectal Cancer (CRC) is still the third most frequent cancer in Spain and the EU and is a leading cause of cancer-related death worldwide. This is despite enormous efforts to implement screening and surveillance programs implemented in many countries over the past ten years and aimed at lowering incidence and mortality. The first part of the present thesis describes how CRC's epidemiology has developed over the last decades, and highlights that the stagnating trend in its incidence and survival rates may be due to some precancerous conditions that are not adequately diagnosed. Difficulties in recognizing these conditions during endoscopic evaluation, and a lack of deeper insights into the underlying molecular mechanisms that lead to cancer development, account for such misdiagnoses. Ulcerative Colitis associated with Colorectal Cancer (UC-CRC) and Serrated Polyposis Syndrome (SPS) are two instances for both observations and two main focuses of this thesis. The introduction explores the current knowledge (and knowledge gaps) about their pathophysiology, and how recent molecular discoveries might be leveraged as diagnostic tools. Precisely, microRNAs are epigenetic regulators that control the expression of multiple genes related to cancer pathways and have emerged as attractive biomarkers not only for CRC diagnosis and prognostication, but also for UC-CRC, yet their role as early biomarkers for neoplastic progression in ulcerative colitis has not been adequately studied.

The first objective of this thesis was to identify potential biomarker candidates for colitis associated dysplasia – a lesion assumed the precursor of UC-CRC and difficult to detect endoscopically. In this study, we analyzed the expression of 96 preselected microRNAs in human formalin-fixed and paraffin-embedded tissues of 52 case biopsies (20 normal mucosa, 20 dysplasia, and 12 UC-associated CRCs) and 50 control biopsies (10 normal mucosa, 21 sporadic adenomas, and 19 sporadic CRCs) by using Custom TaqMan Array Cards. For validation of deregulated microRNAs, we performed individual quantitative real-time polymerase chain reaction in an independent cohort of 50 cases (13 normal mucosa, 25 dysplasia, and 12 UC-associated CRCs) and 46 controls (7 normal mucosa, 19 sporadic adenomas, and 20 sporadic CRCs). As a result, sixty-four microRNAs were differentially deregulated in the UC-associated CRC sequence. Eight of these microRNAs were chosen for further validation. We confirmed that miR-31, -106a, and -135b are significantly deregulated between normal mucosa and dysplasia, as well as across the UC-associated CRC sequence (all $P<0,01$). Notably, these microRNAs also confirmed to have a significant differential expression compared with sporadic CRC (all $P<0,05$).

Aberrant DNA methylation is another epigenetic mechanism that regulates gene expression. It is also observed as a frequent molecular finding in the serrated pathway of colorectal carcinogenesis. Intriguingly, some of these changes seem to be present already in normal appearing mucosa, predisposing to the formation of serrated lesions found in SPS. To identify novel biomarkers for SPS as the second aim of this thesis, fresh-frozen samples of normal mucosa from 50 patients with SPS and 19 healthy individuals were analyzed using the 850K

BeadChip Technology (Infinium). Aberrant methylation levels were correlated with gene expression using a next-generation transcriptome profiling tool. Two validation steps were performed on independent cohorts: first, on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of the normal mucosa; and second, on 24 serrated lesions. The most frequently hypermethylated genes were *HLA-F*, *SLFN12*, *HLA-DMA*, and *RARRES3*; and the most frequently hypomethylated genes were *PIWIL1* and *ANK3* ($\Delta\beta = 10\%$; $P < 0,05$). Expression levels of *HLA-F*, *SLFN12*, and *HLA-DMA* were significantly different between SPS patients and healthy individuals and correlated well with the methylation status of the corresponding differentially methylated region (fold change $>20\%$; $r > 0,55$; $P < 0,001$). Significant hypermethylation of CpGs in the gene body of *HLA-F* was also found in serrated lesions ($\Delta\beta = 23\%$; false discovery rate = $0,01$). In conclusion, epigenome-wide methylation profiling has revealed numerous differentially methylated CpGs in normal mucosa from SPS patients, highlighting hypermethylation of *HLA-F* as a novel biomarker candidate for SPS.

The results of the UC-CRC and SPS studies underscore that by using cutting edge technology, it is possible to identify new biomarkers that may complement current diagnostic strategies in the future and help lower further CRC incidence. Indeed, the last part of the thesis discusses that the field defect observed in both pathologies could be a starting point to develop less invasive diagnostic tests, i.e., in rectal biopsies or blood samples, to screen for high-risk patients before submitting them to a complete colonoscopy – a procedure uncomfortable for patients, costly and with potential adverse events.

When the aim is to improve cancer-related mortality, screening and early detection are not enough since many CRCs are still diagnosed at advanced stages. If they are not detected and treated at an early stage, the precancerous lesions will progress to metastatic dissemination, systematically corrupting the cells of their microenvironment in their favor. Once this stage of the disease has been reached, the prognosis remains dire today, just as it was 30 years ago. For that reason, the metastatic stage of CRC is the third focus of this thesis. The last part of the introduction summarizes the cellular and molecular mechanisms of the tumor microenvironment (TME), which allow cancer cells to escape the body's immune response and metastasize, and explains why classical anti-neoplastic treatments are largely ineffective in this setting. Furthermore, data from preclinical and clinical studies on the effectiveness of recently developed anti-cancer therapies targeting the TME rather than the neoplastic cells are presented, generating new hope for these patients. Yet, the introduction also clarifies that only a subset of patients benefits from these therapies, and that diagnostic tools are missing to adequately predict treatment response. Hence, the third project of this thesis is dedicated to exploring the potential of two recently pioneered culture systems to model the TME and the response to immunotherapy *in vitro*, starting from samples of liver metastases in a preclinical mouse model of metastatic CRC using cutting edge organoid technology. The first system starts from micro-dissected liver metastases that are finely minced without enzymatic digestion to generate so-called second-generation organoids, which are then embedded in an artificial extracellular matrix and placed into a cell culture insert. This creates an air-liquid

interface, allowing oxygen supply from above and diffusion of nutrients and growth factors from below. The second system, called organotypic cultures (OTCs), starts from liver tissue containing metastases, which is cut on a vibratome into 250 μm thick slices, and then put onto a permeable membrane floating on cell culture medium, creating likewise air-liquid interface conditions. Subsequently, air-liquid interface organoids (ALIOs) and OTCs were cultured for several days and analyzed by bioluminescence imaging for their viability, and immunohistochemistry or immunofluorescence for their cellular composition. As a result, we showed that ALIOs continued to grow for more than seven days under basal conditions, before reaching a plateau and then starting to decline. Furthermore, ALIOs and OTCs maintained the original composition of the TME, including tumor epithelial cells, fibroblasts, T cells and myeloid cells, recapitulating also the architectural heterogeneity observed between different metastases of the original liver. However, it was also clear that ALIOs and OTCs soon started to show apoptosis and necrosis in their centers, probably due to precarious oxygen and nutrient supply. Next, ALIOs and OTCs were treated with different targeted therapies, including anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-TGF- β and anti-CSF-1R, added to the cell culture medium. Unexpectedly, both culture systems showed a significant decrease in cancer cell viability between day three and four with anti-PD-1 and anti-PD-L1 monotherapy, while the addition of anti-TGF- β did not further improve the results. These findings were sharp contrasts to the experiments *in vivo*, where only the combination of anti-PD-L1 and anti-TGF- β was able to cure the mice from the low immunogenic CRC metastases in this model, but neither treatment alone. Therefore, while it seems feasible to induce and observe responses to immune checkpoint inhibitors in ALIOs and OTCs *in vitro* in a convenient time frame (as early as three to four days), both systems still harbor important limitations to their predictive accuracy. This project adds valuable information on the weaknesses and shortcomings of both systems, and finally discusses possible further developments to overcome these limitations in the near future.

INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del Cáncer Colorrectal

1.1.1. Incidencia, Mortalidad y Supervivencia

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales causas de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo (1). En Europa (UE-27), el CCR es el tercer cáncer con mayor incidencia en el sexo masculino y el segundo en el sexo femenino, y representa alrededor del 13,2% de todos los cánceres diagnosticados en 2020. El Sistema Europeo de Información sobre el Cáncer (ECIS) estima para 2020 una incidencia anual de 71,8 y 83,4 casos nuevos por 100.000 habitantes en Europa (UE-27) y España, respectivamente (fig. 1a y b), lo que corresponde a 341.419 y 40.441 casos nuevos en Europa (UE-27) y España (2). Con una mortalidad estimada del 46% en Europa (41% en España), el CCR se considera uno de los tumores más mortales. Si bien es cierto que en las últimas dos décadas la incidencia y mortalidad del CCR han disminuido continuamente (fig. 1c), probablemente debido a una mejor detección y tratamiento precoz, al menos en los países donde se han implementado programas de cribado (3), esta disminución oculta el hecho de que hay un aumento en la incidencia en la población menor de 50 años. Esta generalmente no entra a los programas de cribado. Así, entre la población menor a 55 años en Estados Unidos se ha observado un incremento de la incidencia del CCR del 2% anual desde los años noventa del siglo pasado (4). También se ha informado que la disminución de la mortalidad se ha ralentizado recientemente y el CCR sigue siendo el segundo tipo de cáncer más letal detrás del cáncer de pulmón y antes del cáncer gástrico (1). La elevada mortalidad es atribuible a la enfermedad metastásica, aunque las metástasis no sean evidentes en el momento del diagnóstico. En consecuencia, la tasa de supervivencia a los 5 años para el período de 2011 – 2017 solo ha aumentado en 10 puntos con respecto al período de 1978 a 1992 (fig. 2a) (3). La quimioterapia adyuvante ha mejorado la supervivencia desde principios de la década de 2000, especialmente en estadios intermedios, pero no todos los pacientes se benefician por igual mientras están expuestos a efectos secundarios potencialmente graves (5–7). En cambio, la supervivencia de la enfermedad metastásica sigue siendo devastadora, situándose por debajo del 15%, y siendo responsable del estancamiento del pronóstico global del CCR de los últimos años (fig. 2b) (8). Por esta razón es evidente que aparte de mejorar el diagnóstico precoz de CCR y de sus precursores también es imperativo enfocar la investigación hacia optimizar el diagnóstico y tratamiento del CCR metastásico.

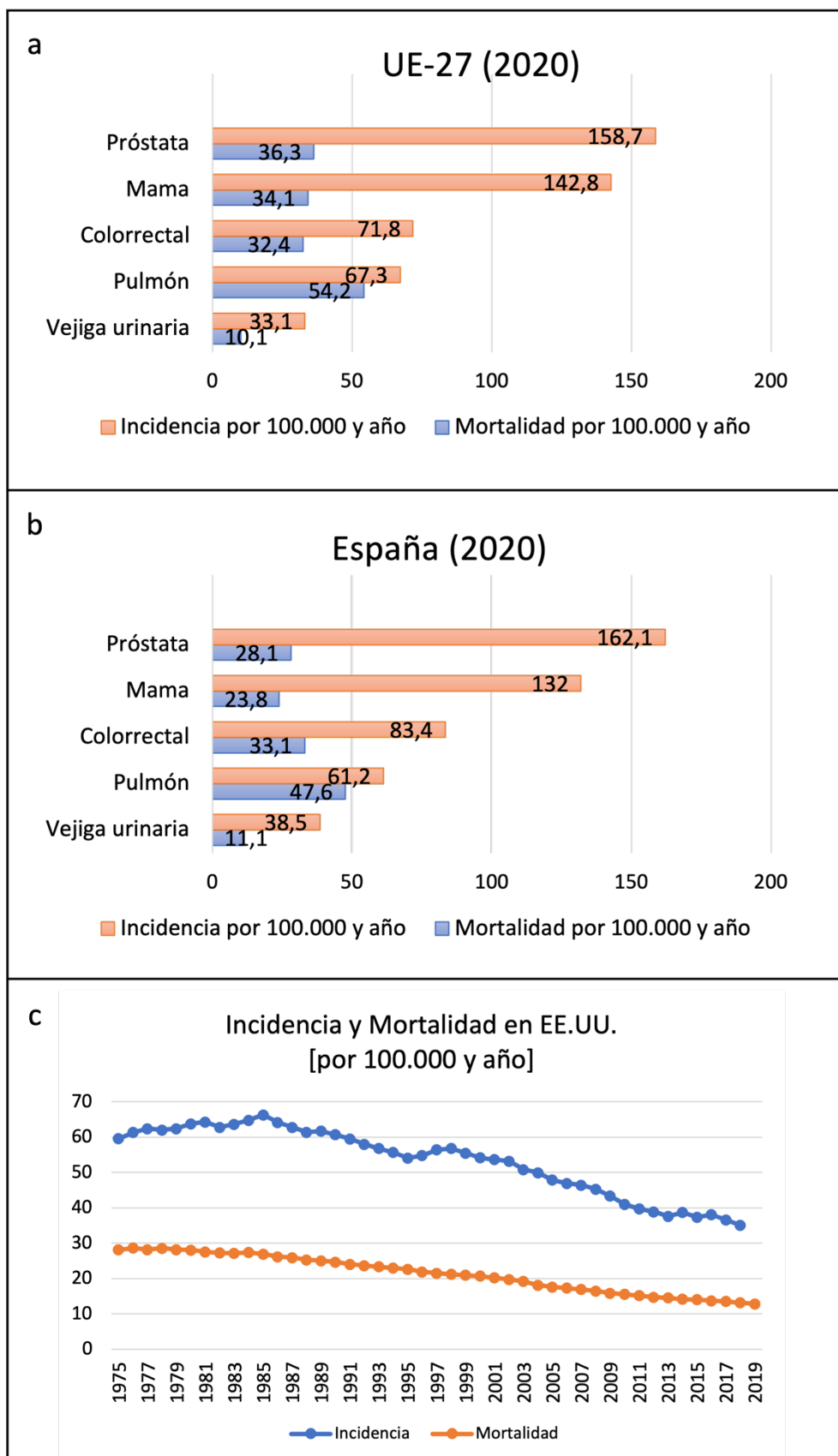


Figura 1 | Epidemiología del Cáncer Colorrectal (I)

a+b, Incidencia y mortalidad de diferentes cánceres en la Unión Europea (a) y España (b) en 2020. **c,** Evolución de la incidencia y mortalidad del CCR en EE. UU. (1975 – 2019). Datos extraídos del Sistema Europeo de Información sobre el Cáncer (ECIS) y del programa SEER - Surveillance, Epidemiology, and End Results Program del NIH National Cancer Institute (ver texto). Gráficas: elaboración propia.

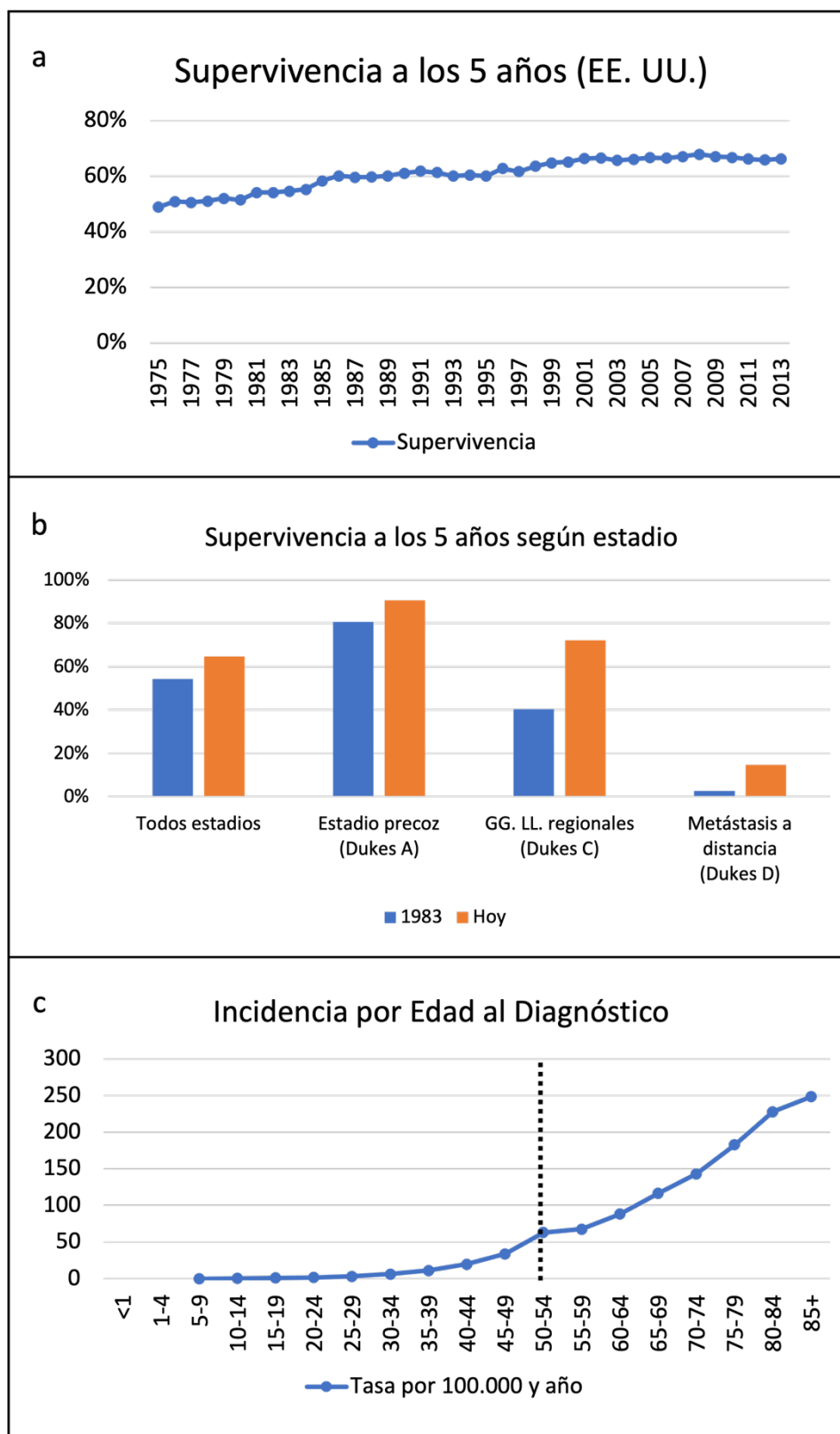


Figura 2 | Epidemiología del Cáncer Colorrectal (II)

a, Evolución de la supervivencia del CCR en EE. UU. (1975 – 2013). **b**, Supervivencia a los 5 años según estadio (1983 vs. hoy). **c**, Tasa de incidencia por grupos de edad. Datos extraídos del programa SEER - Surveillance, Epidemiology, and End Results Program del NIH National Cancer Institute (ver texto). Gráficas: elaboración propia. GG. LL., ganglios linfáticos.

1.1.2. Etiología

Edad e Historia Familiar

El CCR se desarrolla como consecuencia de un acúmulo de alteraciones genéticas y/o epigenéticas (9). Mientras que algunas alteraciones pueden ser hereditarias en algunos pacientes, siempre será necesario que se añadan varias alteraciones más para que se forme un tumor maligno. En este sentido, la edad es un factor de riesgo, ya que, a mayor edad, más tiempo ha tenido una lesión inicial para acumular mutaciones y esto está en línea con la observación que la mayoría de los casos se diagnostican en mayores de 60 años (fig. 2c) (3). Sin embargo, también es cierto que existen condiciones genéticas y ambientales que aceleran este proceso e inducen tumores a edades más tempranas. Otro factor de riesgo importante es la historia familiar. En términos generales, cuantos más familiares afectados y más cercano sea el grado de parentesco, mayor será el riesgo relativo de ser diagnosticado de un CCR (10). Por otro lado, la edad al diagnóstico del CCR en los familiares también modifica el riesgo siendo este menor cuanto más edad tenga el familiar afectado (11).

Factores Genéticos

Teniendo en cuenta la base genética de la enfermedad, desde un punto de vista clínico-epidemiológico se diferencian tres subtipos de CCR: uno, el CCR esporádico; dos, el CCR familiar; y tres, el CCR hereditario con variantes patogénicas germinales conocidas (fig. 3) (12). Brevemente, el CCR esporádico es aquel que evoluciona en una persona sin antecedentes familiares, y representa el subtipo más frecuente ($\approx 65\%$). En el segundo subtipo, existe una agregación familiar de CCR, pero sin cumplir los criterios establecidos para formas hereditarias de CCR. Su proporción de todos los casos de CCR varía según la definición que se aplica, alcanzando los 25-30% si se incluye cualquier caso de CCR con al menos un familiar afecto. En tercer lugar y menos frecuente ($\approx 5-10\%$), el CCR asociado a un síndrome de cáncer hereditario. En estos casos el individuo hereda una variante patogénica en un gen de predisposición al CCR de sus progenitores, aunque en un grupo reducido de individuos también es posible que la variante patogénica aparezca *de novo* en células germinales (13,14). La prevalencia de formas hereditarias se ha establecido clásicamente basada en el cumplimiento de criterios clínicos, lo que ha llevado a una infraestimación de su frecuencia. Estudios muy recientes sugieren que esta prevalencia podría ser más alta, si se aplicara un cribado genético universal a todos los pacientes diagnosticados con cáncer (15). La mayoría de los síndromes hereditarios que se asocian con un alto riesgo de CCR son causados por variantes patogénicas en genes supresores de tumores o de reparación del ADN (16). Según la teoría de dos *hits* de Knudson, para abolir la función de estos genes, se requiere de al menos una variante patogénica en ambos alelos, de las cuales una se hereda a través de la línea germinal (primer *hit*), mientras que la otra se adquiere en las células somáticas a lo largo de la vida (segundo *hit*) (17). La inactivación de ambos alelos sería la base para el inicio de la acumulación de variantes patogénicas en otros genes supresores de tumores dando lugar a un CCR. A modo de resumen, clínicamente se diferencian síndromes que conllevan la aparición de múltiples pólipos a lo largo del tracto intestinal (es decir, síndromes polipósicos) de los síndromes que cursan sin la presencia de

múltiples pólipos (es decir, cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis [abreviado HNPCC según sus siglas en inglés]) (16). El primer grupo engloba la poliposis adenomatosa familiar [PAF], la poliposis adenomatosa familiar atenuada [PAFa], la poliposis asociada al gen *MUTYH* [PAM], las poliposis asociadas a la lectura de prueba de la polimerasa (abreviado PPAP según sus siglas en inglés); así como las poliposis hamartomatosas: poliposis juvenil [SPJu], síndrome de Peutz-Jeghers [SPJ] y los síndromes asociados al gen *PTEN* (es decir, síndrome de Cowden [SC], de Bannayan–Riley–Ruvalcaba [SBRR] y de Proteus [SP]). Al segundo grupo – síndromes non-polipósicos – pertenecen fundamentalmente el síndrome de Lynch y el síndrome Lynch-like. Es importante diferenciar los diferentes subtipos de CCR, ya que presentan riesgos de cáncer muy distintos por lo que se han establecido diferentes estrategias de prevención y manejo clínico. Describir todos los síndromes hereditarios en detalle no está al alcance ni es el objetivo de esta tesis, pero la tabla 1 resume las principales características.

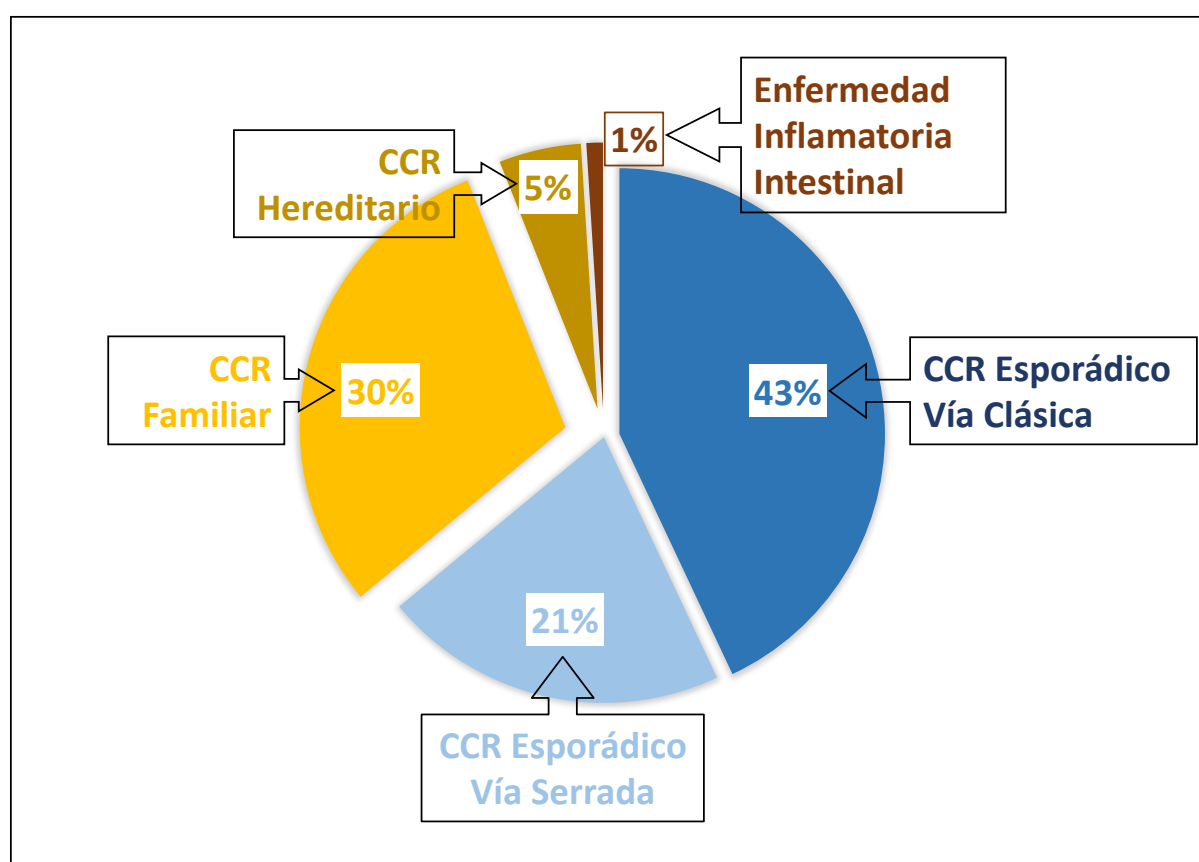


Figura 3 | Proporción aproximada de los subtipos de CCR
Para detalles, ver texto. Gráfica: elaboración propia.

Síndrome	Gen mutado	Modo de herencia	Riesgo de CCR ¹	Lesión precancerosa	Proporción entre todos los CCR ²	Edad de aparición de CCR
Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF)	<i>APC</i>	AD	100%	Adenoma	<1%	35-40 años
Poliposis Adenomatosa Familiar atenuada (PAFa)	<i>APC</i>	AD	70-80%	Adenoma	<1%	54-62 años
Poliposis Adenomatosa asociada al gen <i>MUTYH</i> (PAM)	<i>MUTYH</i>	AR	100%	Adenoma	<1%	50-58 años
Síndrome de Lynch (CCR Hereditario No Polipósico)	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM</i>	AD	Variable 25-75%	Adenoma	3-6%	41-54 años
Poliposis Adenomatosa asociada a la lectura de Prueba de la Polimerasa (PPAP)	<i>POLE/POLD1</i>	AD	20-100%	Adenoma	¿?	36-41 años
Poliposis asociada al gen <i>NTHL1</i>	<i>NTHL1</i>	AR	¿?	Adenoma	¿?	¿?
Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ)	<i>LKB1/STK11</i>	AD	≈57%	Hamartoma	<1%	34-46%
Síndrome de Poliposis Juvenil (SPJu)	<i>SMAD4/BMPR1</i>	AD	10-40%	Hamartoma	<1%	42-44%
Síndrome de Hamartomas Múltiples (SHM, o Síndrome de Cowden)	<i>PTEN</i>	AD	9%	Hamartoma	<1%	44 años
Síndrome de Poliposis Mixta Hereditaria (SPMH)	<i>GREM1</i>	AR	¿?	Mixto (hiperplásicos, juveniles atípicos y adenomas)	<1%	40 años
Síndrome de Poliposis Serrada (SPS)	<i>RNF43</i> ³	¿? (poligénico, epigenético)	¿? (2%)	Lesión serrada	¿? ⁴	47-51 años
CCR familiar tipo X (cumple los criterios de Ámsterdam II, pero sin MMRd ni MSI)	¿? Varios propuestos	¿?	¿? (menor que Lynch)	Adenoma	¿?	¿? (mayor que Lynch)
CCR familiar	¿? Solo genes de susceptibilidad	¿? (poligénico, factores ambientales)	Depende del nº de familiares y grado de parentesco	Adenoma o lesión serrada	25-35%	¿? (menor que esporádico, pero >50% son mayores a 50 años)

Tabla 1 | Síndromes con Alto Riesgo de Cáncer Colorrectal

Los datos están extraídos de: Spoto CPE, et al. *Semin Diagn Pathol* (2018)(18) y Lorans M, et al. *Clin Colorectal Cancer* (2018)(19). 1. Se estima que el riesgo de por vida de padecer un CCR esporádico es del 4-6% y la media de edad de su presentación los 68 – 72 años. 2. Se estima que el 3-6% de todos los CCR tienen una causa hereditaria, por lo que la proporción de la mayoría de los síndromes será muy inferior al 1% (salvo el síndrome de Lynch). 3. Recientemente se han identificado varios genes de predisposición al SPS, p. ej. Soares de Lima Y, et al. *Cancers (Basel)* (2021)(20) y Murphy A, et al. *J Gastroenterol Hepatol* (2022)(21). 4. Se estima que el 15-30% de los CCR esporádicos desarrolla a través de la vía serrada. Abreviaturas: AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo.

Estilo de Vida

La gran mayoría de los CCR no estará causada por una variante patogénica heredada sino será fruto del estilo de vida de los pacientes. Esto es especialmente cierto para los cánceres esporádicos, pero también muy relevante en los CCR familiares en donde los miembros de la familia suelen presentar un estilo de vida similar si bien también pueden compartir una predisposición genética (12). Incluso en los síndromes hereditarios los factores del estilo de vida pueden modificar el riesgo de desarrollar cáncer. Así, una reciente revisión sistemática sugiere varios factores que pueden incrementar o disminuir el riesgo de CCR en pacientes con síndrome de Lynch (22). De ahí, la importancia de fomentar un estilo de vida saludable en todos los individuos – afectados o no de un síndrome hereditario de cáncer. Los factores con evidencia científica más sólida que se han asociado a un incremento del CCR son el consumo del alcohol (23,24), el tabaco (25), el consumo frecuente de carne roja y procesada (26) y la obesidad (27,28); por otro lado, una dieta alta en fibra alimentaria (23) y el ejercicio físico regular se han asociado con un menor riesgo (29). Para otros factores dietéticos (como el consumo de pescado, café y leche o la toma de ciertas vitaminas) la evidencia es más débil o contradictoria, bien por una menor asociación con el riesgo o por una menor calidad de los estudios debido, en parte, a la complejidad de la relación entre dieta y cáncer, y la dificultad de diseñar estudios prospectivos y aleatorizados.

Colitis Ulcerosa

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria crónica del colon que se ha asociado a un incremento del CCR (30,31). Comparado con la población general, se ha estimado que el riesgo de CCR es aproximadamente dos veces mayor en los afectados por enfermedad inflamatoria intestinal (EII) sin diferencias entre la CU y la enfermedad de Crohn (EC) con afectación colónica (32). En un metaanálisis del 2017 en el que se incluyeron 14 estudios de cohortes sometidos a seguimiento endoscópico se calculó una incidencia anual agrupada del 0,8% para el CCR y del 1,8% para la neoplasia avanzada (33). En la misma revisión se incluyeron doce estudios de cohortes (n=450 pacientes) en los que se detectaron 34 (17%) CCR sincrónicos en las piezas quirúrgicas (33). En otro metaanálisis que incluyó 44 estudios de cohortes de todos los países asiáticos con un total de 31.287 pacientes se calculó una prevalencia general del 0,85% y unas incidencias acumuladas a 10, 20 y 30 años del 0,02%, 4,81% y 13,81%, respectivamente (34). Para Europa, en un estudio escandinavo más antiguo (2000), la incidencia acumulada a los 20 años fue también similar (5.3%) (35). Sin embargo, en otro metaanálisis del 2014 que incluyó 81 estudios con casi 200.000 pacientes procedentes mayoritariamente de EE. UU., Europa, Australia y en menor proporción de Asia calculó una incidencia anual global a los 10, 20 y más de 20 años del 0,91%, 4,07% y 4,55%, respectivamente, pero reveló una gran heterogeneidad geográfica. A pesar de las diferencias entre regiones, a partir de prácticamente todos los estudios se puede concluir que el riesgo de desarrollar un CCR está directamente relacionado con la duración de la enfermedad (36). En la misma línea, en estudios más recientes de Europa se observó que el riesgo global de CCR en la CU no difiere de la población general (RR 1,07, [95%IC 0,95 – 1,21]), pero sí es más alto para los que tienen una duración de la enfermedad más prolongada (37). Un factor de riesgo

adicional es la extensión de la enfermedad. En un amplio estudio poblacional francés (“CESAME”) del 2013 se calculó una proporción de incidencia estandarizada significativamente mayor en pacientes con colitis extensa de larga duración (es decir >50% del colon afectado y >10 años de duración) comparado con aquellos sin colitis extensa y de corta duración (7,0 vs. 1,1, respectivamente) (38). Además, algunos estudios sugieren que el grado de inflamación también está directamente asociado al riesgo de CCR (39,40), que la duración y la inflamación tienen un efecto acumulado (41) y que, en cambio, conseguir la curación histológica de la mucosa supone un factor protector (42). Por último, los pacientes que además de la colitis padecen una colangitis esclerosante primaria son especialmente proclives a contraer un CCR con una razón de probabilidad del 7,47 [95%IC 3,44 – 16,21] comparado con aquellos pacientes que no la padecen (43). Si bien parece que en la década de los 2.000 la incidencia de CCR en la CU bajó significativamente comparado con los años 50 del siglo pasado (36), otras cohortes sugieren que el riesgo de CCR en pacientes con EI no ha disminuido significativamente durante los últimos 35 años (44). Es por ello por lo que la prevención del CCR asociado a la colitis ulcerosa (CCR-CU) merece una especial atención (ver apartado 3 de la Introducción) y será uno de los temas de esta tesis.

Síndrome de Poliposis Serrada

El síndrome de poliposis serrada (SPS) se caracteriza por la aparición de múltiples y/o grandes pólipos serrados (PS) a lo largo del colon y recto. Según la definición de la OMS del 2019 se establece el diagnóstico cuando se cumple al menos uno de los siguientes criterios: (I) se han detectado al menos cinco PS proximales al recto y al menos dos de ellos miden al menos 10 milímetros; (II) se han detectado más de veinte PS de cualquier tamaño de los que al menos cinco se localizan proximalmente al recto (45). Llamado antiguamente “Síndrome de Poliposis Hiperplásica” se consideraba una entidad inherentemente benigna (46,47). Sin embargo, recientemente ha ido ganando mucha atención entre la comunidad médico-científica por tres razones: uno, desde la implementación de los programas de cribado se ha visto que su prevalencia es mayor que la previamente asumida. Así, se diagnostica en una de cada 200 colonoscopias de cribado a base de una prueba de sangre oculta en heces positiva (48). Dos, debido a las características morfológicas de sus lesiones precursoras (pálidas, pequeñas, planas y cubiertas por moco), éstas pasan desapercibidas muy a menudo y como consecuencia la prevalencia es probablemente más alta que la descrita (fig. 4). En este sentido, se ha descrito que el número de casos se triplica cuando se hace una colonoscopia de seguimiento al año en los pacientes que presentaron al menos una lesión serrada igual o mayor a cinco milímetros proximal al sigma, pero aún no cumplían criterios de SPS en la colonoscopia basal (49). Tres, el SPS se ha asociado claramente con un incremento de riesgo de desarrollar CCR, si bien este riesgo es muy variable entre las diferentes series y depende de muchos factores. Así, en una serie retrospectiva unicéntrica del 2010 se calculó una incidencia acumulada a los 10 años del 7%, mientras que era del 1,0% en un estudio prospectivo unicéntrico del 2020 (50,51). En otra serie retrospectiva, pero multicéntrica, se calculó una incidencia acumulada a los cinco años del 1,9% (52). La aparente mejoría en las series más recientes es probablemente debida a su diseño prospectivo y la consiguiente mejor

adherencia a las guías de práctica clínica (GPC) las cuales recomiendan la resección de todas las lesiones serradas y la posterior vigilancia a intervalos de uno o dos años (53). Además, no hay que olvidar que estos estudios fueron realizados en centros de referencia con un alto volumen de pacientes con SPS y un alto nivel de especialización.

Si bien el SPS comparte el incremento de riesgo de CCR con los síndromes polipósicos descritos en apartados previos, este se diferencia claramente de ellos en múltiples aspectos. Primero, hasta la fecha no se ha identificado ninguna alteración genética o molecular que cause o predisponga a su desarrollo y estuviera presente en todos los afectados de SPS, a excepción de variantes patogénicas en el gen *RNF43* en algunas familias con SPS (20,54). Segundo, si bien la evidencia actual sugiere que existe una mayor influencia de factores ambientales (p. ej. el tabaco) y que estos podrían estar en íntima relación con alteraciones epigenéticas, esta hipótesis aún no se ha demostrado en profundidad. Tercero, la supuesta lesión premaligna no es el adenoma sino el pólipo serrado el cual presenta características macroscópicas, histológicas y moleculares muy distintas al anterior (fig. 4 y 5). Según las características histológicas se diferencian tres tipos de pólipos serrados: (I) el pólipo hiperplásico (PH); (II) la lesión serrada sésil (LSS)¹; y (III) el adenoma serrado tradicional (AST) (55,56). Cuarto, existen fenotipos del SPS mucho más variados comparado con otros síndromes polipósicos debido, al menos en parte, a la variabilidad de la contribución de factores ambientales por un lado y de las alteraciones moleculares por otro, las cuales aún están ampliamente desconocidas si bien ya se han propuesto algunos mecanismos como se verá en el segundo apartado de la introducción de la tesis (57,58). En familiares de primer grado (FPG) de afectados por SPS, estudios retrospectivos han sugerido que el riesgo de CCR es aproximadamente cinco veces más alto comparado con la población general (59–61). Además, hasta una tercera parte de los FPG pueden presentar lesiones serradas múltiples o proximales lo cual se ha corroborado en estudios prospectivos (62,63). Estos datos apoyan la noción de que existe un componente genético y/o epigenético en esta condición. Sin embargo, hay que enfatizar que la agregación familiar en el SPS es baja en general y que la mayoría de los tumores en los FPG se han diagnosticado en mayores de 50 años (63).

La evidencia en relación al estilo de vida como factor de riesgo para el desarrollo de lesiones serradas y/o el SPS es aún escasa, pero en varios estudios de casos y controles se ha visto una fuerte asociación con el consumo de tabaco (64–66). En el estudio más reciente publicado por IJspeert y colegas en 2016, por ejemplo, se observó que los fumadores activos eran casi cinco veces más probables de tener al menos una lesión serrada avanzada (es decir, una LS

¹ Debido al hecho que muchas lesiones pueden aparecer no polipoides, se ha propuesto abandonar el término 'pólipo' y hablar solamente de 'lesión' (397). Para rendir tributo a esta propuesta y evitar confusiones, en esta tesis se usará el término 'lesión serrada' cuando no se refiere a ningún subtipo de lesión serrada en particular (es decir, engloba los tres subtipos: PH, LSS o AST); y se usará el término lesión serrada sésil (LSS) cuando se refiere a este subtipo en particular. En la literatura también se está usando el término 'lesión/pólipo serrado sésil' (SSL/P con sus siglas en inglés), pero con el fin de simplificar, en esta tesis solo se usará LSS. En el caso del AST, se seguirá usando el término 'adenoma' ya que es el que más se usa en la literatura si bien su morfología tiene más en común con una lesión serrada que con un adenoma.

que medía >10 mm y/o tenía displasia) comparado con los que nunca habían fumado (67). En cambio, con el consumo de alcohol no se ha visto una asociación tan clara hasta ahora y con otros potenciales factores existen resultados inconsistentes (por ejemplo, la obesidad, el consumo de carne roja y la ingesta de calcio, fibra y ácido fólico) (65).

En resumen, el SPS presenta una gran variabilidad fenotípica y genotípica – que está dificultando predecir la historia natural, el pronóstico y el riesgo de desarrollar CCR, por un lado, y derivar recomendaciones y estrategias para su prevención, tratamiento y vigilancia, por otro lado. De ahí resulta la importancia de entender mejor las bases moleculares de esta entidad con el fin de desarrollar nuevos biomarcadores para una mejor estratificación de los pacientes, siendo éste otro de los temas centrales de la presente tesis.

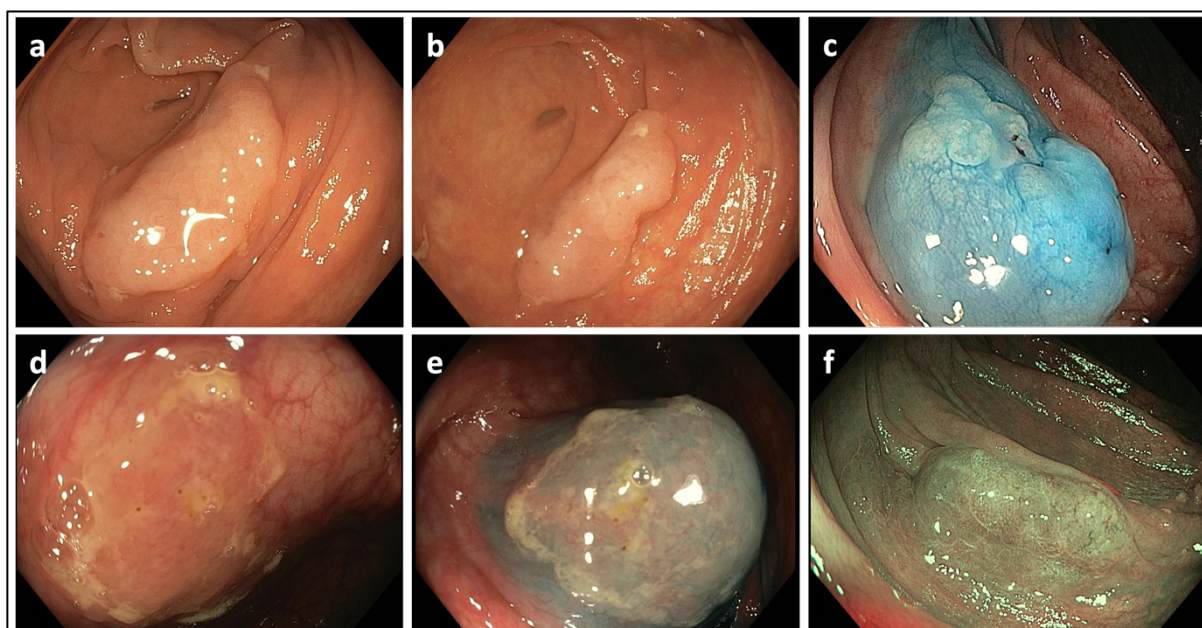


Figura 4 | Imagen endoscópica de las lesiones serradas

Se muestran seis imágenes endoscópicas de lesiones serradas. Las fotos **a – e** se han realizado con un colonoscopio con luz blanca y alta definición; la foto **f** con cromosondoscopia virtual (NBI). Las lesiones serradas suelen tener un aspecto pálido por lo que se confunden fácilmente con pliegues de mucosa normal (**a+b**). Además, pueden ser muy planas y cubiertas por moco dificultando aún más su identificación (**d**). Incluso tras su elevación inyectando gelafundina e índigo carmín en su base (**c+e**) y con cromosondoscopia virtual (**f**) puede seguir siendo difícil delimitar sus bordes. Fotos: cortesía de la Dra. María Pellisé (Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona).

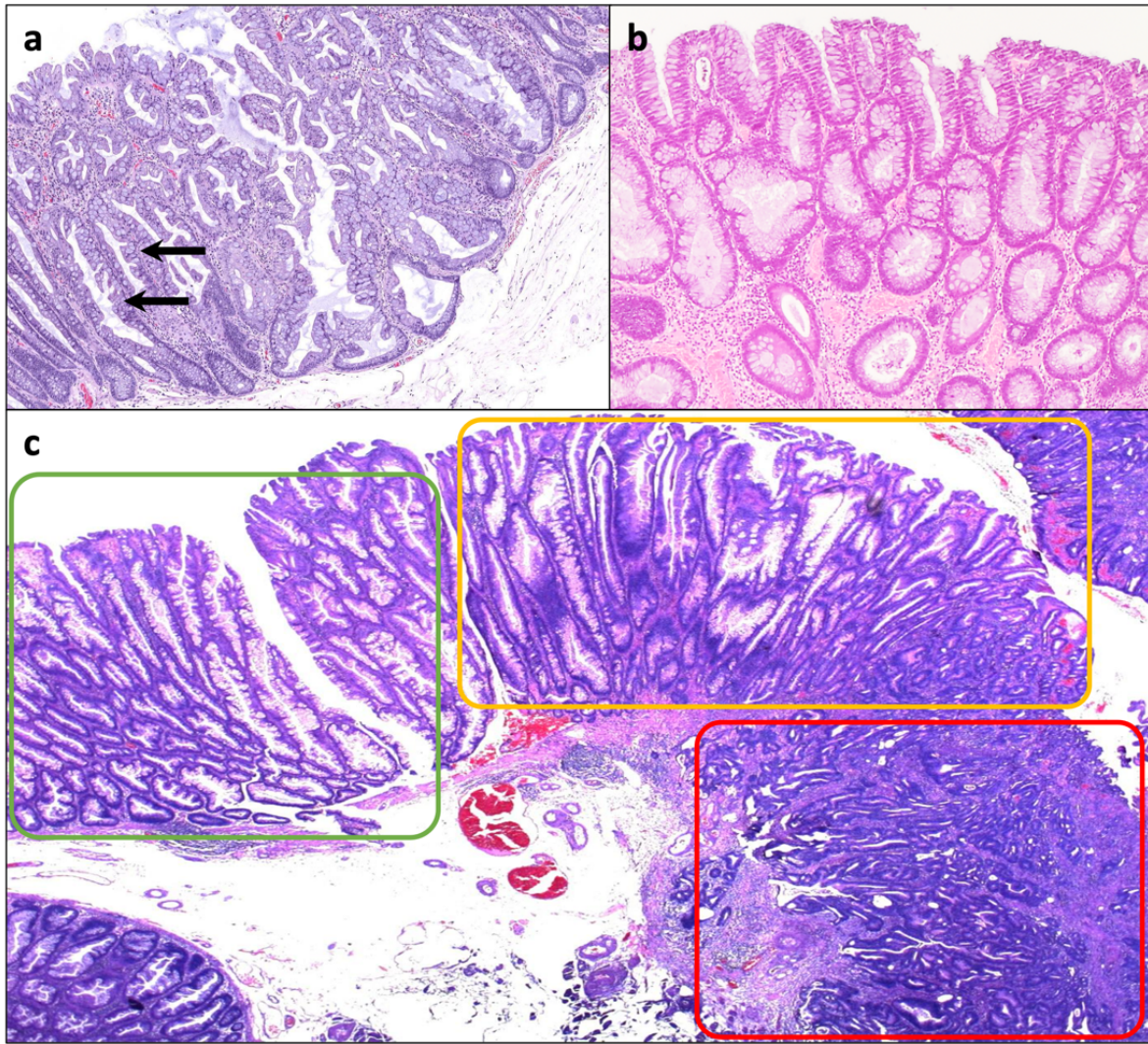


Figura 5 | Imagen histológica de las lesiones serradas

a, lesión serrada sésil con la típica configuración en “diente de sierra” en la base de la cripta (flechas) en comparación a un adenoma tubular con displasia de bajo grado que muestra una base de la cripta lisa (**b**). La imagen **c**, corresponde a una muestra en la que coexisten tres diferentes estadios de la vía serrada: una lesión serrada sin displasia (marco verde), una lesión serrada con displasia (marco amarillo) y un adenocarcinoma serrado (marco rojo). Fotos: cortesía de la Dra. Míriam Cuatrecasas (Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona).

1.2. Fisiopatología del Cáncer Colorrectal

1.2.1. Consideraciones Generales

Homeostasis epitelial en las criptas del colon

La mucosa colónica normal se renueva por completo cada cinco a siete días, un proceso que tiene su origen en la base de la cripta (fig. 6) (68). Allí es donde residen las células madre (ingl. *stem cells*) que reciben señales de su entorno (o nicho; ingl. *stem cell niche*) en forma de

factores de señalización (por ejemplo, WNT, R-Spondin, EGF, Noggin). Estos factores controlan la capacidad “stem” y la división celular. Tras una zona de amplificación transitoria (ingl. *Transit Amplifying Cells* o células TA), donde las células proliferan de manera activa, éstas entran en un proceso de diferenciación terminal mediado por otras moléculas de señalización (por ejemplo, BMP) y dando lugar a células con funciones específicas propias del colon: colonocitos (absorción), células caliciformes (secreción de moco), células enteroendocrinas (secreción de hormonas y neuropéptidos) y las células *tuft* (quimiosensación). Mientras siguen madurando y emplean plenamente sus funciones, continúan migrando hacia la superficie de la cripta donde inician la muerte celular programada (apoptosis) y se descaman a la luz intestinal (68). Este proceso de renovación continua (que incluye división celular, diferenciación y apoptosis) está regulado de forma altamente concertada por las señales del *stem cell niche* y las correspondientes vías de señalización (ingl. *pathways*) de las células de la cripta (68). Hace relativamente poco se demostró que el proceso de diferenciación no es unidireccional ni irreversible, sino que existe una enorme plasticidad celular, cuando las condiciones lo requieran (69,70).

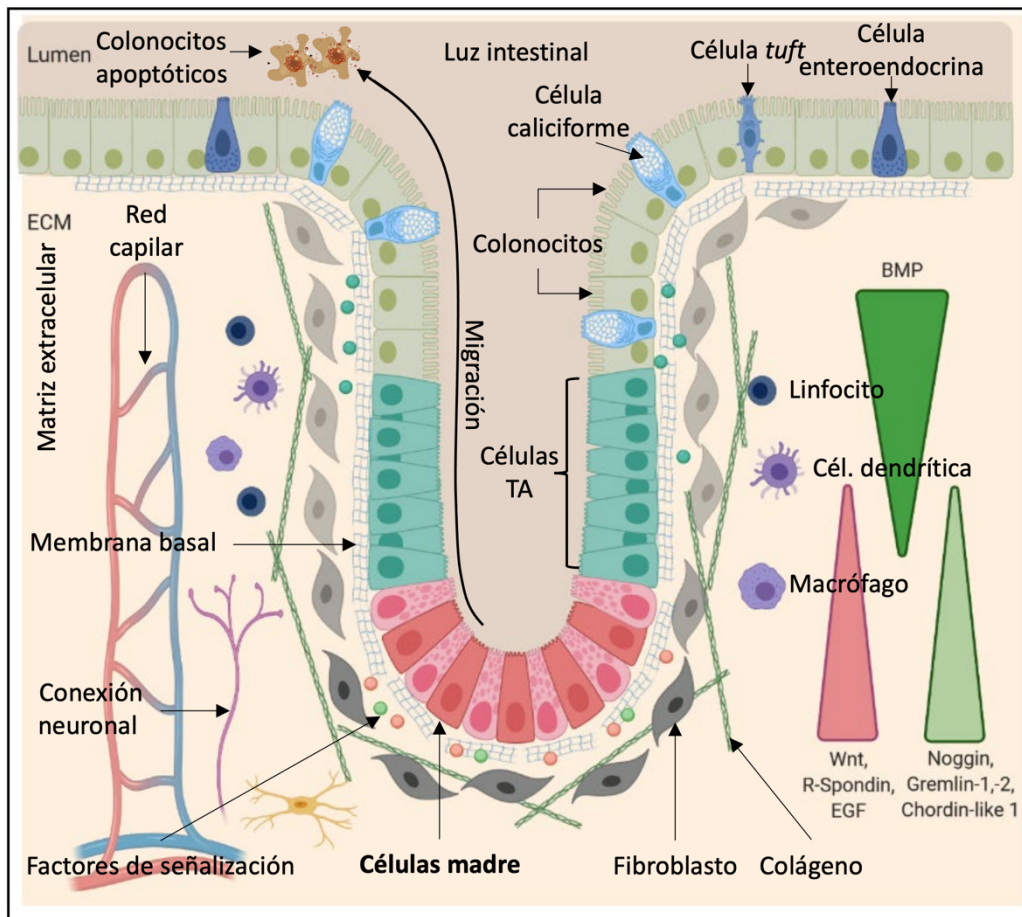


Figura 6 | Cripta colónica normal

Representación de la arquitectura de una cripta colónica normal con sus componentes celulares y estromales. Los triángulos en la parte derecha muestran los gradientes de diferentes factores de señalización a lo largo de la cripta responsables para la división de las células madre y su diferenciación. Gráfica extraída y modificada de: Onfroy-Roy L, et al. *Cells*. 2020 Dec 7;9(12):2629. doi: 10.3390/cells9122629.

Evolución del Cáncer y Heterogeneidad

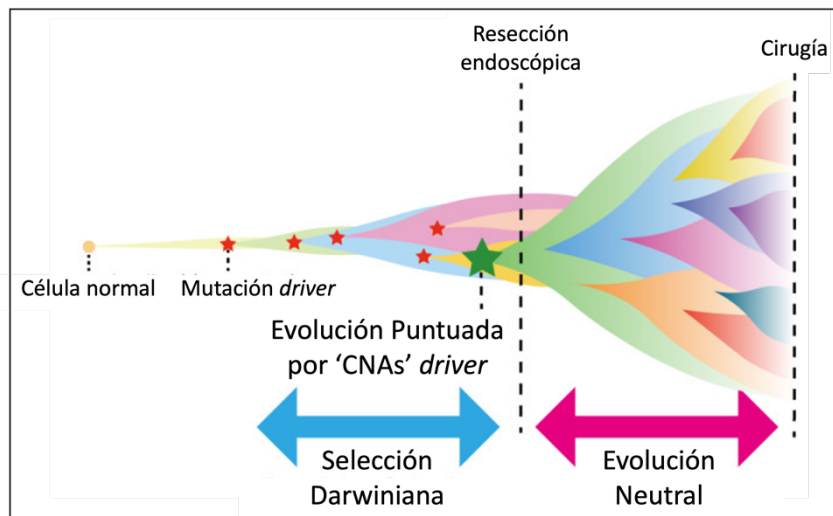


Figura 7 | Evolución del Cáncer

Para detalles, ver texto. Gráfica extraída y traducida de:
Niida A, et al. *J Hum Genet.* 2021 Sep;66(9):869-878.
doi: 10.1038/s10038-021-00930-0

La fisiopatología molecular del CCR es compleja y heterogénea, resultando en una inmensa variedad genotípica y fenotípica entre los pacientes y dentro de un mismo tumor (71). En general, el CCR, visto como una masa con crecimiento descontrolado, se desarrolla mediante un proceso evolutivo durante el cual las células que han adquirido las propiedades para resistir la presión selectiva durante dicha evolución contribuyen a su crecimiento (fig. 7) (72). En otras palabras, el CCR no es el resultado de la expansión clonal de una sola célula maligna, sino que es un conjunto de diferentes clones de células epiteliales, todos con alteraciones genéticas y epigenéticas distintas, pero evolutivamente relacionadas, que han hecho posible escapar los mecanismos moleculares y celulares destinados a evitar su crecimiento. De ahí se explica la enorme heterogeneidad intratumoral que se ha observado en aquellos estudios que han secuenciado el genoma, el transcriptoma y el epigenoma en diferentes regiones del mismo tumor (73–75). Asimismo, los análisis de expresión génica han demostrado que la composición celular de un CCR se asemeja a la cripta sana, porque contiene no solo células proliferativas sino también grandes compartimentos de células diferenciadas (llamadas células tumorales maduras), si bien con una arquitectura de la cripta completamente distorsionada. Se asume que solo una pequeña fracción de células – las células madre cancerígenas (o *cancer stem cells* en inglés, *CSC*) – contribuye *de facto* a su crecimiento (76–78). Por lo tanto, el CCR puede tener su origen en una de las células madre de la base de la cripta. Más recientemente se ha descrito una vía alternativa de carcinogénesis que tiene su origen en partes más altas de la cripta, donde el evento inicial sería la pérdida de la apoptosis previo a un proceso de *de-diferenciación*, durante el cual las células adquieren propiedades semejantes a las células madre de la cripta (ingl. *stem cell-like*) con capacidad de proliferación descontrolada y, eventualmente invasión y diseminación (79).

En ambas vías, las alteraciones genéticas y epigenéticas harán que las células cancerígenas sean independientes de las señales de crecimiento del nicho, eviten la diferenciación para mantener un estado de división continuada, y eviten la apoptosis.

1.2.2. La Vía Clásica: Adenoma → Carcinoma

En 1990, Fearon y Vogelstein propusieron un modelo genético según el cual el CCR se desarrolla a base de una acumulación de variantes patogénicas en genes implicados en los procesos anteriormente mencionados siendo el adenoma la lesión inicial de la secuencia adenoma-carcinoma (o vía clásica) (fig. 8) (9). Aunque hoy se sabe que este proceso acumulativo no es lineal, sino que está sujeto a selección Darwiniana como hemos visto en el apartado anterior, el modelo es bastante preciso para predecir el comportamiento de un tumor. Integrando los dos modelos, un cáncer presentará mutaciones fundadoras (ingl. *founder mutations*) que han aparecido en estadios precoces y se encontrarán en todas las regiones de un CCR evolucionado, mientras que las mutaciones progresoras (ingl. *progressor mutations*) solo se presentarán en algunas ramas y subclones (72). En ambos casos, las mutaciones son esenciales para la iniciación y la progresión del tumor por lo que se han denominado mutaciones conductoras de cáncer (ingl. *cancer driver mutations*), en contraposición a las mutaciones pasajeras (ingl. *passenger mutations*) que co-ocurren durante la evolución del tumor, pero sin conferir una ventaja de supervivencia.

Usando una plataforma que permite evaluar la contribución de las mutaciones a la carcinogénesis de diferentes tumores, se ha estimado que existen unos 568 genes conductores de cáncer (80). Usando la misma herramienta para el CCR, se han identificado unos 70 genes conductores, 25 de los cuales ya estaban anotados previamente para el CCR, 40 que ya estaban anotados para otros tumores y cinco que se han identificado de nuevo en este estudio reciente del 2021 (80). En cuanto a la vía clásica del CCR, la mutación fundadora más importante es la inactivación del gen *APC* la cual conduce a la activación permanente de la vía de señalización WNT y resulta en la formación de un adenoma. En línea con esto, la mayoría de los adenomas esporádicos (el 100% en la PAF) y un 85% de los CCR esporádicos presentan una variante patogénica en este gen o en otro relacionado con la vía de señalización WNT (81). En esta fase precoz con una única mutación conductora, el adenoma sigue siendo una lesión premaligna y es completamente curable, si se reseca. De ahí los programas de cribado para la detección en esta fase precoz y los protocolos de seguimiento para la resección de lesiones metacrónicas.

Para desarrollar su potencial de malignización, la lesión requiere además de mutaciones activadoras en oncogenes de las vías de señalización RAS/RAF/MAPK (por ejemplo, en los genes *KRAS* o *BRAF*), así como mutaciones inactivadoras en genes supresores de tumores relacionados con las vías de la apoptosis o la detención del ciclo celular (por ejemplo, *TP53*) y con la vía del factor de crecimiento transformante beta (por ejemplo, en los genes *SMAD4* o *TGFBR2*) (9,82). Por consiguiente, se encuentran mutaciones somáticas en *KRAS*, *BRAF*, *TP53*,

SMAD4 y *TGFBR2* en aproximadamente el 35-45%, 8-12%, 35-55%, 10-35% y 25-30% de los casos, respectivamente (82). Se estima que la formación de un CCR a partir de un adenoma tarda entre 10 y 20 años lo cual justifica un intervalo de 10 años para el cribado de CCR mediante colonoscopia en la población de riesgo medio (83). También se ha estimado que la transformación de un CCR precoz en un CCR invasivo con potencial de metastatización puede ser inferior a 2 años (84).

En línea con la detección de variantes patogénicas en los genes previamente mencionados en muestras humanas, se ha confirmado en modelos preclínicos que solo la combinación de varias variantes patogénicas es capaz de generar un fenotipo invasor y que, para poder metastatizar, la célula cancerígena tiene que haber perdido la dependencia a los factores del nicho (85,86). Por lo tanto, para generar metástasis hepáticas en el modelo de esta tesis se trabajará con organoides que albergan mutaciones en cuatro de los genes conductores clásicos: *APC*, *KRAS*, *TP53* y *TGFBR2*.

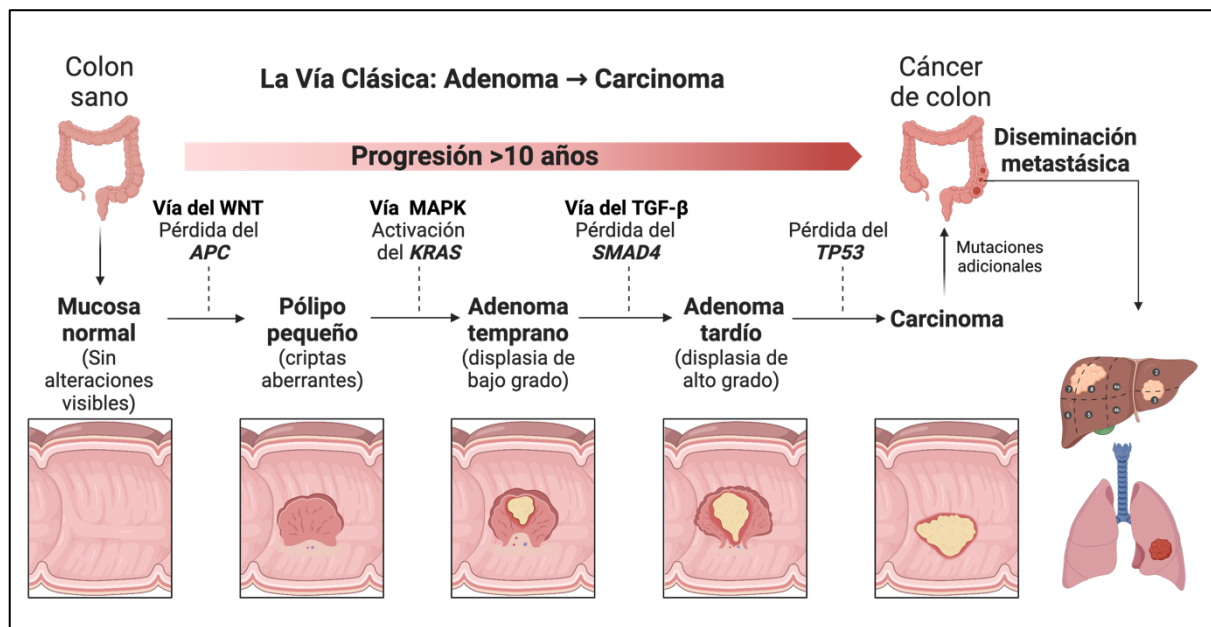


Figura 8 | La vía clásica del CCR

La gráfica ilustra los diferentes pasos de la carcinogénesis de la vía clásica del CCR con las vías de señalización implicadas y los genes más frecuentemente mutados en cada vía. Fuente: elaboración propia inspirada por: Markowitz S, et al. *N Engl J Med* (2009) y elaborada mediante bioRender.com.

1.2.3. La Vía Serrada: Lesión Serrada → Carcinoma

En los años 90 del siglo pasado se describió por primera vez una vía de carcinogénesis alternativa a la vía clásica – llamada vía serrada – cuya lesión precursora no es el adenoma sino la lesión serrada (fig. 9) (87). Se estima que un 15-20% de los CCR esporádicos se desarrolla por esta vía, aunque la prevalencia podría ser más alta, puesto que puede ser

indistinguible de un tumor de la vía clásica en fases avanzadas si se basa solo en criterios histológicos (88). Diferente al adenoma, existen varios subtipos de lesiones serradas, todas ellas con características endoscópicas, histopatológicas y moleculares muy distintas lo cual explica su variabilidad en el potencial de malignización, por un lado, y la dificultad de desvelar las vías moleculares de la ‘carcinogénesis serrada’, por otro (55). De hecho, la evidencia actual sugiere que no existe una única vía serrada, sino que diferentes vías pueden causar diferentes fenotipos y el resultado final puede ser un adenocarcinoma serrado o un adenocarcinoma convencional (89). Sin embargo, todas las lesiones serradas comparten como característica común del epitelio de sus criptas una configuración en “dientes de sierra” como consecuencia de una acumulación de colonocitos secundaria a una inhibición de la apoptosis (90). Se ha propuesto que el origen de esto es una activación de la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) debido a una variante patogénica en los genes *BRAF* o *KRAS* conduciendo a la formación de un pólipo hiperplásico (PH) o de un adenoma serrado tradicional (AST) (89).

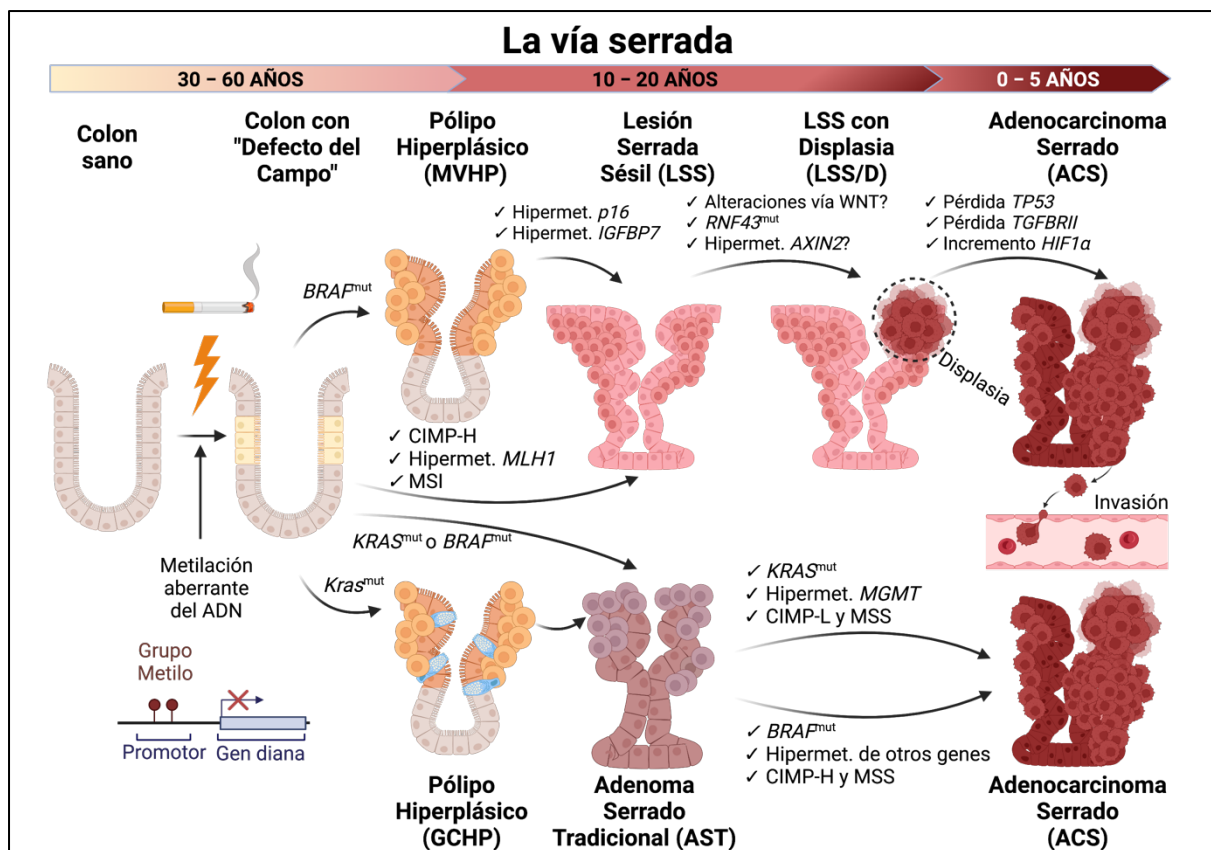


Figura 9 | La vía serrada del CCR

La gráfica ilustra los diferentes pasos de la carcinogénesis serrada del CCR (simplificada). Dentro de la vía serrada se diferencian dos vías alternativas: la vía serrada sécil (arriba) y la vía serrada tradicional (abajo). Para más detalles, ver texto. MVHP, *microvesicular hyperplastic polyp*; Hipermet., hipermetilación; GCHP, *goblet cell rich hyperplastic polyp*. Fuente: elaboración propia inspirada por: De Palma F, et al. *Cancers* (2019) y Murcia O, et al. *World J Gastroenterol* (2016), y elaborada mediante bioRender.com.

Mutaciones en la vía de señalización MAPK

Los pólipos hiperplásicos (PH) ricos en células caliciformes (*'goblet cell rich hyperplastic polyp'* en inglés, GCHP) se asocian a variantes patogénicas en el gen *KRAS*, los PH microvesiculares (*'microvesicular hyperplastic polyp'* en inglés, MVHP), en cambio, en el gen *BRAF* y se ha descrito que los AST pueden estar mutados en *BRAF* o *KRAS*, pero nunca estarán mutados los dos genes en la misma lesión. En condiciones sanas, la vía MAPK es activada por señales extracelulares, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o diferentes citoquinas a través de los receptores tirosina-quinasa, pero su activación induce un estado irreversible de senescencia con el fin de evitar la división descontrolada. Por lo tanto, para que una lesión serrada pueda continuar proliferando, requiere de mecanismos adicionales que desvíen la senescencia inducida por estos oncogenes (91). Una posibilidad es a través de la metilación y el consiguiente silenciamiento epigenético de determinados genes supresores de tumores como el *IGFBP7* cuya función normal es la regulación de la disponibilidad de los factores de crecimiento insulínico (IGF1 y 2) o el *p16* (sinónimo *CDKN2A*) – un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas y por lo tanto implicado en la regulación del ciclo celular (92,93). El resultado morfológico de estas alteraciones es la lesión serrada sésil (LSS), la cual puede derivar por lo tanto de un MVHP, pero también es motivo de debate si la LSS puede desarrollarse sin el paso previo del pólipo hiperplásico (fig. 8) (89). Morfológicamente, la LSS comparada con el pólipo hiperplásico suele tener una extensión lateral mucho mayor, ser plana o plano-elevada, tener bordes irregulares y mal delimitados, y una superficie en forma de nube (fig. 4) (94). Todas estas características son la consecuencia de una mayor proliferación e inhibición de la apoptosis comparado con los pólipos hiperplásicos. Asimismo, suelen estar cubiertas por mucosidad, expresión de la mayor producción de mucinas. De hecho, la sobreexpresión de algunas mucinas se ha propuesto para diferenciar la LSS de otros tipos de pólipos (por ejemplo del adenoma convencional y del adenoma serrado tradicional) y como marcadores precoces de una posible transformación maligna (95).

El fenotipo metilador alto o bajo (CIMP-H, CIMP-L) y la (in)estabilidad de los microsatélites (MSS, MSI)

En la mayoría de los casos, la metilación de los genes supresores de tumores ocurrirá en el contexto del fenotipo metilador (CIMP-H), un fenómeno molecular en el que existe metilación aberrante del promotor de múltiples genes. La evidencia actual sugiere que este fenómeno ya puede existir en la mucosa sana (es decir, de apariencia macro y microscópicamente normal) como un 'defecto de campo' (es decir, de forma parcheada a lo largo del colon) predisponiendo a la aparición de (múltiples) pólipos serrados y eventualmente cumpliendo los criterios de SPS, si se suman las mutaciones previamente descritas (96). Como una de las posibles causas del fenotipo metilador se ha propuesto el consumo del tabaco (97). Así, el consumo activo del mismo ha sido un fuerte predictor de la presencia de lesiones serradas avanzadas, pero no para adenomas convencionales en dos grandes cohortes recientes de cribado poblacional en EE. UU. y Europa (66,67). Adicionalmente, otros factores de estilo de vida o ambientales pueden desempeñar un rol. Por otro lado, se han descrito casos con múltiples LSS en los que se han identificado mutaciones germinales en genes que regulan la

senescencia siendo posibles candidatos para los casos familiares de SPS (91). En cambio, los GCHP suelen presentar una variante patogénica en el gen *KRAS* y tener un fenotipo metilador bajo (CIMP-L) o ausente (CIMP-0), lo cual explica probablemente su bajo o nulo potencial de progresar hacia lesiones avanzadas y cáncer (98). Aquí cabe destacar que no existe consenso sobre qué marcadores a usar ni tampoco cuántos de ellos definirían un fenotipo metilador alto (CIMP-H) o bajo (CIMP-L), lo cual ha llevado a resultados inconsistentes entre los estudios y no ha permitido el uso del CIMP como herramienta diagnóstica o marcador pronóstico en la práctica clínica (99).

El siguiente paso en la carcinogénesis de la vía serrada sésil es la aparición de displasia y esta se ha asociado a dos eventos adicionales. En primer lugar, a la hipermetilación del gen *MLH1* resultando en la inestabilidad de microsatélites (MSI), y, en segundo lugar, del gen *MGMT*, sin alteración del sistema de reparación del ADN (con microsatélites estables – MSS). En ambos casos, debido a la pérdida de proteínas implicadas en la reparación del ADN, se ocasiona un estado de hipermutación que eventualmente afectará a aquellos genes supresores de tumores que en condiciones normales evitarían la invasión y diseminación de las células, por ejemplo, el *TP53* cuya función es inducir la apoptosis cuando una célula no es capaz de reparar los daños del ADN.

La vía serrada tradicional

La vía de carcinogénesis que parte de los adenomas serrados tradicionales (AST) se ha denominado vía serrada tradicional. A diferencia de los PH y LSS, los AST podrían desarrollarse a partir de una mutación en el gen *BRAF* o *KRAS*, pero con la diferencia de que la variante patogénica del *BRAF* estaría asociada con un alto nivel metilador (CIMP-H), mientras que el *KRAS* con un bajo nivel metilador (CIMP-L). Sin embargo, en ambos casos el AST se asocia a tumores MSS. Igual que las LSS, el AST también puede progresar hacia la displasia, si bien ésta se parecerá a la de un adenoma convencional en los *KRAS* mutados y CIMP-L, mientras que será una displasia serrada en los que tienen el *BRAF* mutado y son CIMP-H (100). El silenciamiento de más genes supresores de tumores a través de la hipermetilación de sus promotores (por ejemplo, del *MGMT*) y la adquisición de más variantes patogénicas (sobre todo en el *TP53*), definirá si un AST con displasia progresa a un cáncer invasivo o no (89,100).

El adenocarcinoma serrado

Como se ha visto en los apartados anteriores, existen lesiones serradas (los AST con *KRAS*^{mut}, MSS y CIMP-L) que se originan por la vía serrada tradicional, pero terminan como un adenocarcinoma convencional (ACC). Además, algunas lesiones serradas sésiles evolucionan como un CCR esporádico, pero con características histológicas y moleculares de un tumor con inestabilidad de microsatélites. Por otro lado, el adenocarcinoma serrado (ACS) es aquel que presenta una arquitectura serrada y puede originarse en un AST con MSS (80% de los casos) o en una LSS con MSI (20% de los casos). Se ha estimado que un 9% de todos los CCR son ACS y globalmente se ha asociado a un peor pronóstico (101). Puesto que el AST se localiza preferentemente en el recto-sigma y la LSS en colon ascendente, estas son también las dos localizaciones en donde se suele detectar el ACS (101). Análisis de expresión y estudios

epigenéticos han demostrado que el ACS y el ACC son dos entidades molecularmente muy distintas. Del mismo modo, dentro de la vía serrada, los ACS y los CCR esporádicos con patrón de MSI-H también difieren sustancialmente en su expresión génica (102,103).

1.2.4. La Vía Inflamatoria: Inflamación → Displasia → Carcinoma

Tanto a nivel macroscópico como a nivel molecular la carcinogénesis del CCR asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal (CCR-EII) difiere sustancialmente del CCR esporádico (fig. 10). Macroscópicamente, se inicia en una mucosa crónicamente inflamada, ya sea por colitis ulcerosa (CU) o por enfermedad de Crohn (EC) con afectación colónica. La duración y la gravedad de la inflamación marcan si se desarrollan lesiones displásicas de bajo grado (DBG) en el epitelio intestinal que pueden progresar a displasia de alto grado (DAG) y, eventualmente cáncer. (fig. 10 y 11) (104). En caso de que la anatomía patológica no fuese capaz de diferenciar los cambios reactivos de una mucosa con inflamación activa de las alteraciones verdaderamente displásicas, se hablaría de una lesión ‘indefinida para displasia’ (ID) (105). Los datos actuales son inconsistentes en cuanto al riesgo de progresión de las ID a la DAG o al CCR-EII pero según los dos estudios más grandes se sitúa probablemente por encima del riesgo de la mucosa inflamada sin displasia (1%) y por debajo o al mismo nivel que la DBG (45%) (106,107). Por esta razón, su manejo clínico debería ser como el de la última (108,109). También cabe destacar que la displasia progresa más bien de forma continua que en categorías discretas, lo cual explica la baja concordancia entre observadores para diferenciar la ID y la DBG (110). Otra diferencia con los adenomas de la secuencia adenoma-carcinoma es que las lesiones displásicas en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) a menudo son planas en lugar de polipoideas, miden menos de 10 mm y presentan bordes indistintos dificultando su detección durante la endoscopia (fig. 12) (111,112). Además, las tasas de lesiones metacrónicas y de recurrencia son más altas en la EII comparado con la secuencia esporádica y se asocian con la extensión previa del área colítica (107). Esta multifocalidad probablemente se debe al hecho de que la inflamación genera un defecto de campo que predispone a la formación de neoplasias, incluso previo a la aparición de alteraciones morfológicas (similar a lo que se observa en el SPS) (113,114).

Figura 10 | La vía inflamatoria del CCR (ver siguiente página)

La gráfica ilustra los diferentes pasos de la carcinogénesis de CCR partiendo de una mucosa crónicamente inflamada (simplificado). La alteración de la microbiota (disbiosis) junto con una barrera intestinal debilitada y la infiltración por células proinflamatorias que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) dañan directamente al epitelio y causan mutaciones en el ADN. La liberación de citoquinas y la activación de varias vías de señalización mantienen ciclos repetidos de inflamación, daño y reparación tisular lo cual favorece el acúmulo de mutaciones, alteraciones epigenéticas y cambios en la expresión de microARNs en las células premalignas. Esto resulta en variantes patogénicas en oncogenes y genes supresores de tumores, siendo la mutación del *TP53* un evento temprano en esta vía de carcinogénesis. Finalmente, los cambios en el microambiente provocan la aparición de un cáncer invasivo.

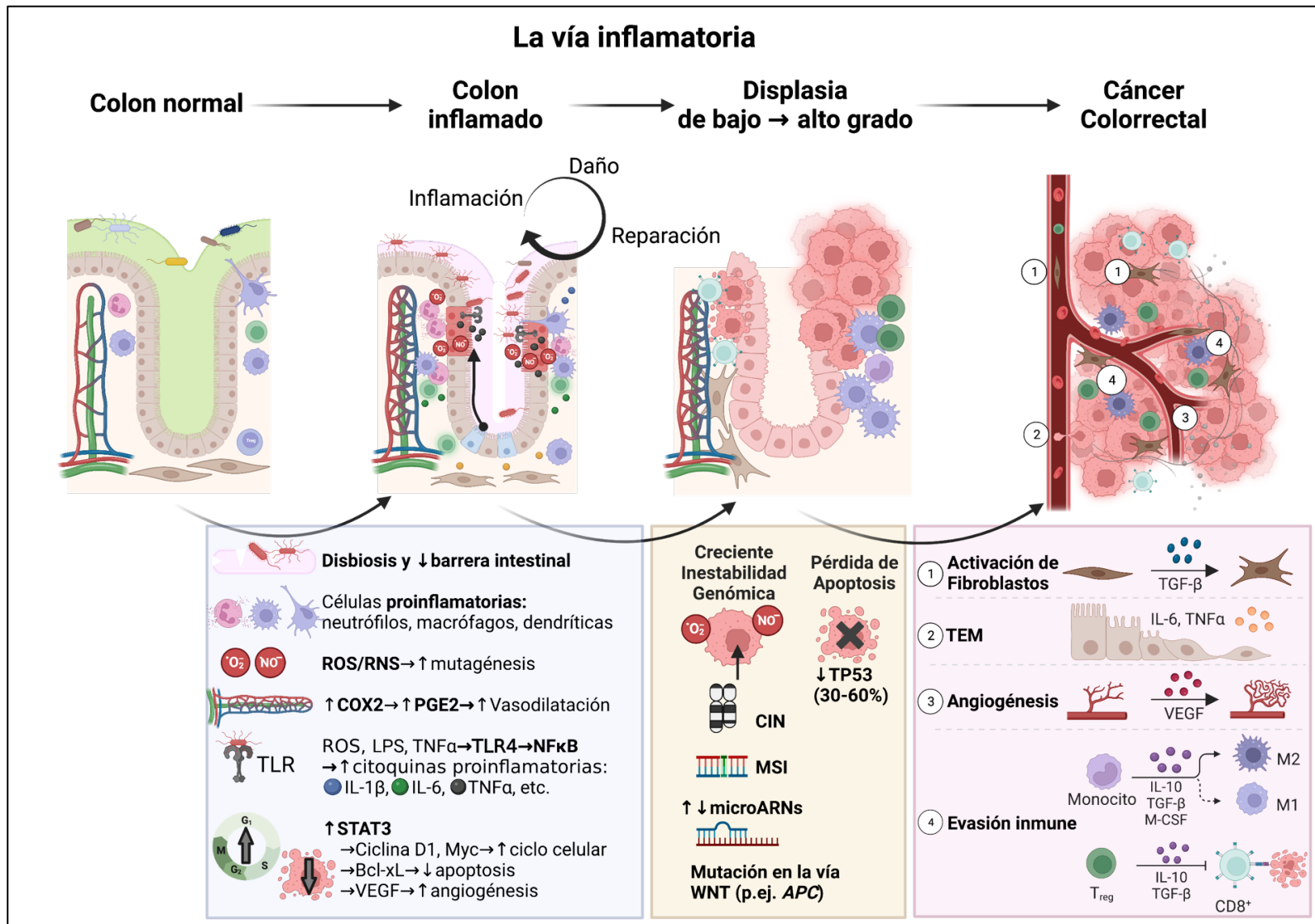


Figura 10 | La vía inflamatoria del CCR (continuación)

Abreviaturas: TLR, receptores *toll-like*; LPS, lipopolisacáridos; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; CIN, inestabilidad cromosómica; MSI, inestabilidad de microsatélites; TEM, transición epitelio-mesénquima. Fuente: elaboración propia inspirada por: Muller M, et al. *United European Gastroenterol J* (2020) y Hirano T, et al. *Int J Mol Sci* (2020), y elaborada mediante bioRender.com.

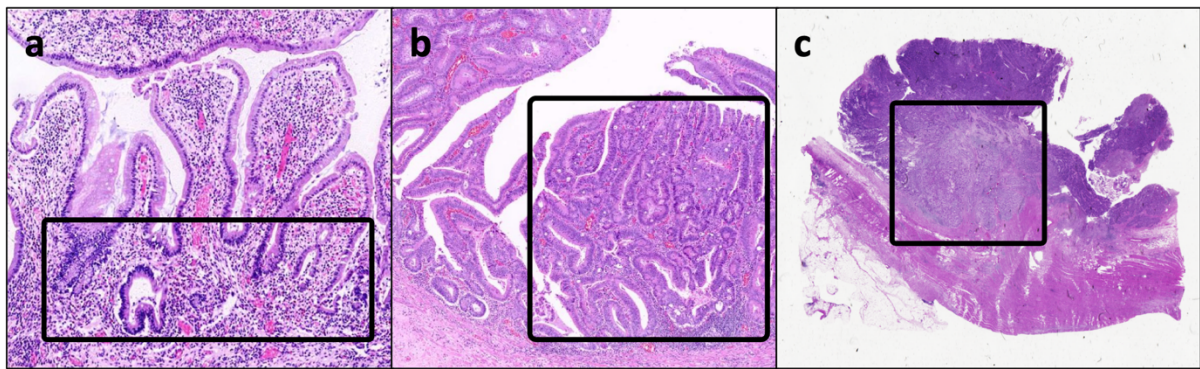


Figura 11 | Histología de las lesiones asociadas a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal
a, mucosa colónica inflamada con infiltración por linfocitos y polimorfonucleares provocando cambios reactivos en el epitelio. **b**, la cuadrícula marca un área de displasia asociada a la EII. **c**, carcinoma de colon infiltrante asociado a EII. Fotos: cortesía de la Dra. Míriam Cuatrecasas (Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona).

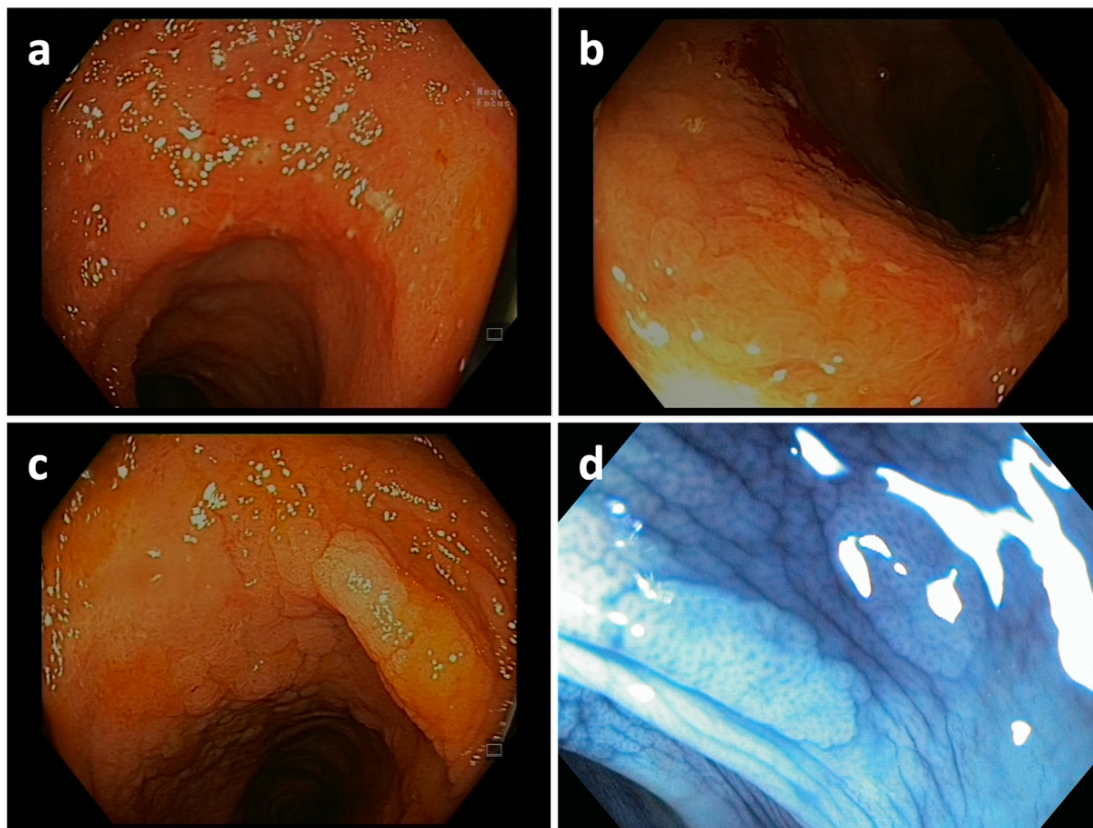


Figura 12 | Imagen endoscópica de la displasia asociada a la EII
a, marcada inflamación de la mucosa colónica con pérdida de patrón vascular, eritema y erosiones haciendo imposible la diferenciación contra la displasia. **b y c**, muestran el aspecto plano de las lesiones displásicas y la dificultad de delimitar sus bordes. **d**, cromoendoscopia convencional mostrando dos pequeñas y muy sutiles lesiones displásicas planas. Fotos: cortesía de la Dra. María Pellisé (Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona).

Estrés Oxidativo e Inestabilidad Genómica

La patogénesis del CCR-EII está menos estudiada, pero existen estudios comparativos que usan la secuenciación pan-exómica de alto rendimiento y han logrado identificar diferencias en los perfiles de mutación entre el CCR-EII y el CCR esporádico. Del mismo modo, se han revelado mutaciones comunes a ambas entidades. (115). Además, disponemos de estudios experimentales con ratones en los que se induce la colitis mediante diferentes métodos, por ejemplo, con la administración rectal de dextranosulfato sódico [ingl. DSS] o azoximetano [AOM], y se analiza el impacto de mutaciones específicas o alteraciones inmunológicas sobre la capacidad de formar tumores en la mucosa inflamada (116). En contraposición al modelo más lineal de la secuencia adenoma-carcinoma, la evidencia disponible sugiere que las variantes patogénicas en el CCR-EII se generan a consecuencia de ciclos repetidos de daño celular con inflamación crónica y reparación tisular con activación inmunológica. La inflamación crónica tiene un efecto mutagénico a través del estrés oxidativo mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) resultando en daño al ADN de las células epiteliales y la consiguiente inestabilidad genómica (117). Asimismo, la inflamación crónica puede causar peroxidación lipídica de las membranas celulares resultando en más daño tisular y manteniendo así la inflamación (118). Los daños al ADN finalmente sobrecargan al sistema de reparación del ADN el cual además puede estar afectado por las variantes patogénicas causadas en el gen *MLH1* o por hipermetilación de su promotor acelerando así el proceso de inestabilidad genómica (119). En este sentido, se ha observado una alta tasa de inestabilidad cromosómica y de microsatélites en los CCR-EII (119,120). Aunque el CCR-EII comparte muchas alteraciones con el CCR esporádico, la frecuencia y la secuencia temporal de ellas difieren notablemente. Por ejemplo, mientras que la mutación del gen *TP53* es un evento tardío en el CCR esporádico, se pierde en fases tempranas durante la carcinogénesis del CCR-EII, incluso antes de la aparición de una displasia visible (121). En un estudio se ha detectado la pérdida de heterozigosidad del gen *TP53* en el 6% de las muestras sin displasia, el 33% con displasia de bajo grado, el 63% con displasia de alto grado y el 85% en las muestras de CCR-EII (122). La inactivación del *TP53* en fases precoces hace las células especialmente susceptibles a más daño del ADN, puesto que pierden la capacidad de detener el ciclo celular en la transición del G1/S, pierden la capacidad de inducir el sistema de reparación del ADN así como de inducir la senescencia y la apoptosis cuando ya no es posible reparar los daños causados (123). Esto podría explicar, al menos en parte, la carcinogénesis más acelerada en el CCR-EII. Por otro lado, la mutación del gen *APC* con la consiguiente activación de la vía WNT constituye el evento inicial en los adenomas esporádicos, mientras que en el CCR-EII es un hallazgo tardío y menos frecuente (124). De forma similar, la mutación activadora en el gen *KRAS* es tardía y también menos frecuente que en el CCR esporádico (124). También se han identificado algunas variantes patogénicas que son poco frecuentes en el CCR esporádico, pero se hallan con cierta frecuencia en el CCR-EII, por ejemplo, el factor de transcripción SOX9 – conocido por sus funciones durante la morfogénesis de muchos órganos (124). El mismo estudio encontró en el CCR-EII un enriquecimiento de variantes patogénicas en genes que

regulan la comunicación intercelular y la adhesión celular, y estas estaban asociadas con la disregulación de múltiples citoquinas (124).

Citoquinas Proinflamatorias y Proliferación

Al mismo tiempo que ocurre la mutagénesis, la inflamación y el daño tisular activan los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, e inducen la liberación de una multitud de citoquinas proinflamatorias que activan varias vías de señalización no solo en las células inmunes sino también en las células epiteliales promoviendo su crecimiento, supervivencia y su inmortalidad, por ejemplo a través de la inhibición de señales apoptóticas (125). Una de las vías de señalización más frecuentemente activadas en la colitis y el CCR-EII es la del NF- κ B. El NF- κ B es un conjunto de varios factores de transcripción que se activan a consecuencia de diferentes estímulos extracelulares. Entre ellos destacan las especies reactivas de oxígeno (ROS), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y otras citoquinas que los activan a través de sus correspondientes receptores transmembrana. Los productos bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS), en cambio, transmiten esta señal a través de los receptores *Toll-like*. El NF- κ B también puede ser inducido por estímulos intracelulares, sobre todo genotóxicos (126). Entre los genes dianas de los NF- κ B se hallan citoquinas proinflamatorias que favorecen la proliferación de las células inmunes y epiteliales, factores proangiogénicos y antiapoptóticos que favorecen la supervivencia y la invasión, y proteasas que favorecen el remodelamiento de la matriz extracelular y la invasión (125). Al observar una mayor activación de esta vía en el CCR-EII comparado con mucosa no displásica, parece ser la responsable de la transformación de la inflamación a la neoplasia (127,128). Además, en un estudio experimental con ratones con CCR-EII inducido por AOM/DSS y deficientes en el IKK β – una quinasa que media la inactivación del inhibidor del NF- κ B (I κ B), se observaron tumores de menor tamaño (129). Uno de los múltiples genes diana de los factores de transcripción NF- κ B es la interleucina 6 (IL-6). Aparte de su rol clave para la supervivencia y la diferenciación de las células T en los procesos inflamatorios de la colitis, también parece regular la supervivencia y la proliferación de las células epiteliales desempeñando un importante rol en la homeostasis y la regeneración tisular (130). Ejerce su función a través del receptor IL-6R α induciendo la activación de la vía de señalización JAK/STAT. Así, en el CCR asociado a la colitis ulcerosa (CCR-CU) se ha observado una sobreactivación del STAT3 – un factor de transcripción con múltiples genes dianas que favorecen la proliferación epitelial a través de la inducción de la ciclina D1. Asimismo, aumentan la supervivencia a través de la inducción del inhibidor de la apoptosis Bcl-xl y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual induce la formación de nuevos vasos (131). En el CCR-EII se ha observado una correlación de los niveles séricos de IL-6 con el tamaño del tumor, el estadio y las metástasis (132). Otro mecanismo importante en el microambiente tumoral de los CCR-EII es la secreción de la citoquina IL-23 por las células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos. La IL-23 activa los neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y células Th17 causando la liberación de otras citoquinas proinflamatorias como la IL-17A/F y la IL-6 lo cual potencia la inflamación y acelera la progresión neoplásica (133). Por último, otro efecto de la inflamación es la sobreexpresión

de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), lo cual incrementa la síntesis de varias prostaglandinas, especialmente la prostaglandina E2 (PGE2) siendo la responsable, entre otros efectos, de la vasodilatación. Esta no solo promueve la inflamación, sino también la formación de neoplasias (125). Así, en un estudio con ratones deficientes en el gen *COX-2* y *knock-out* del gen *APC* se observó un menor número de neoplasias comparado con ratones con la proteína COX-2 funcional (134).

La Epigenética

La expresión de oncogenes y genes supresores de tumores no solo es regulada por estímulos externos a través de citoquinas y otros factores de crecimiento a través de las vías de señalización mencionadas, sino también por una red compleja de mecanismos epigenéticos (135). Anteriormente ya hemos mencionado la tendencia del CCR-EII de presentar hipermetilación de promotores con la consiguiente inhibición de la expresión génica de genes supresores de tumores, por ejemplo, del *MLH1*. Otra capa de regulación epigenética constituye la expresión de microARNs (fig. 13). Los microARNs son ácidos ribonucleicos monocatenarios no codificantes de una longitud entre 21 y 25 nucleótidos que son complementarios, en mayor o menor medida, a su ARN codificante diana (pueden ser varias dianas) e inhiben su expresión génica a través de diferentes mecanismos que aún no se han entendido por completo: la inhibición de la iniciación, elongación o terminación de la traducción o degradación de la proteína durante la traducción (136). Existe evidencia muy abundante sobre el rol de los microARNs en la fisiopatología del CCR y como potenciales biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta al tratamiento (135). Funcionalmente, los microARNs pueden actuar como supresores de tumores cuando previenen la traducción de ARNs provenientes de oncogenes, y como onco-MIRs cuando previenen la traducción de ARNs provenientes de genes supresores de tumores. Para el CCR-EII la evidencia (aun) es menos abundante, pero se han identificado algunos microARNs con funciones interesantes en su fisiopatología (137). A modo de ejemplo, miR-31 se ha detectado sobreexpresado de forma progresiva desde la mucosa inflamada, las lesiones displásicas hasta el cáncer por lo que parece ser un evento precoz en la progresión neoplásica. Además, se han detectado niveles casi tres veces mayores en el CCR-EII comprado con el CCR esporádico sugiriendo un importante rol para la carcinogénesis asociada a la colitis (138). A nivel molecular, dos de sus dianas importantes son el gen del factor inhibidor del factor inducible por hipoxia-1 (FIH-1) y el gen de la proteína activadora p21 del RAS-1 (*RASA1*) (fig. 13). La sobreexpresión del miR-31 previene la traducción de ambos factores. Como consecuencia, se pierde la función inhibitoria del FIH-1 sobre el HIF-1 α favoreciendo así la neoangiogénesis inducida por la hipoxia en el centro de la neoplasia, lo cual asegura su supervivencia (139). Por otro lado, se pierde la función inhibitoria del *RASA1* sobre el RAS, por lo que la vía de señalización flujo abajo del RAS-Raf-MEK estaría más activa (140). Este mecanismo molecular explicaría la observación en un estudio en CCR esporádico, en que la sobreexpresión del miR-31 podría ser un potencial predictor a la respuesta con antagonistas del receptor del EGF (141). Aparte del miR-31 se han identificado varios microARNs más con un potencial rol en la carcinogénesis del CCR-EII. Así, en un estudio que comparó la expresión

de microARNs entre muestras de CCR-EII y controles de EII sin neoplasias se identificaron treinta microARNs desregulados. No está al alcance de esta tesis describir todas las potenciales funciones fisiopatológicas de los microARNs, pero se discutirán las funciones de los que se han identificado en el proyecto de esta tesis (ver la discusión).

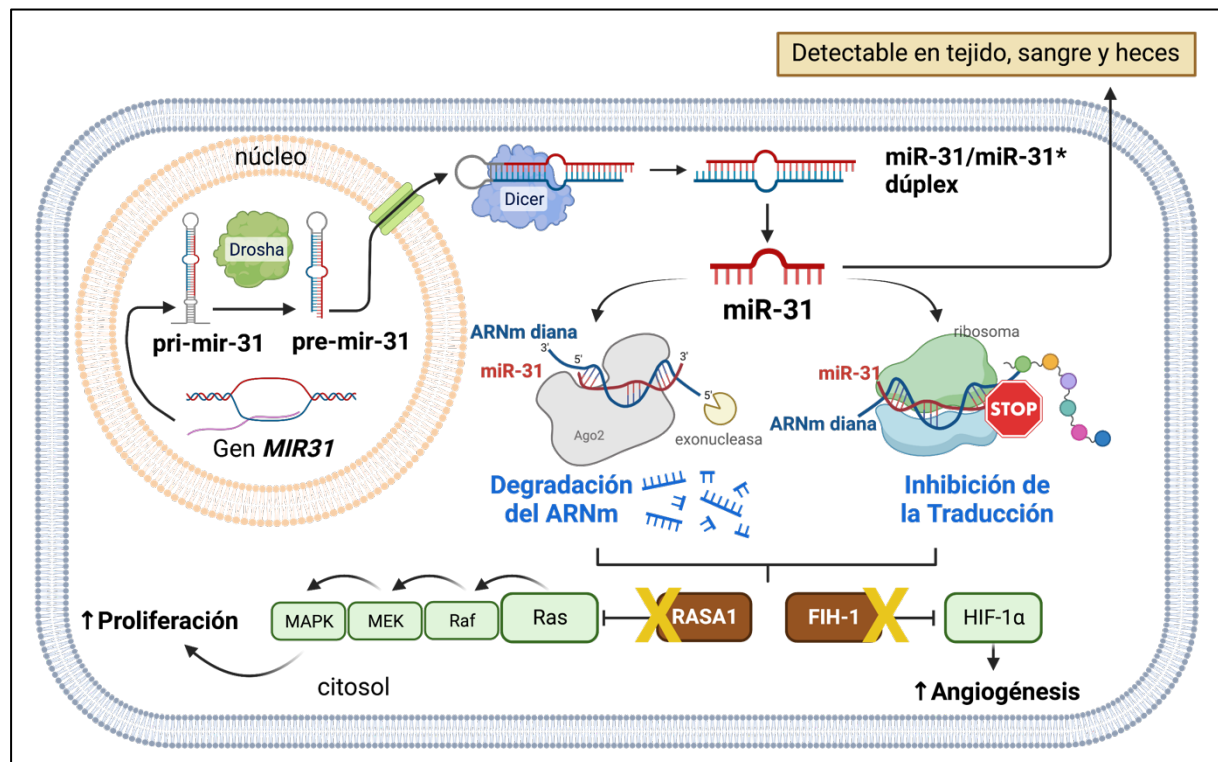


Figura 13 | Biogénesis y mecanismos de acción de los microARNs (simplificado)

La gráfica ilustra la biogénesis y dos posibles mecanismos de acción de los microARNs sirviendo miR-31 como ejemplo. La biogénesis empieza en el núcleo con la síntesis del pri-microARN a partir del gen *MIR*. Un complejo proteico llamado microprocesador que contiene la nucleasa Drosha convierte el pri-microARN en pre-microARN. En el citosol este es procesado al microARN maduro mediante la ribonucleasa DICER. El microARN se empareja con su ARN mensajero (ARNm) diana e imposibilita así su traducción. En el caso del miR-31, este previene la expresión de las proteínas RASA1 y FIH-1 resultando en una desinhibición de las vías Ras/Raf/MEK e HIF-1 α , respectivamente. Fuente: elaboración propia inspirada por Moein S, et al. *J Cell Physiol* (2019) y creada mediante BioRender.com.

El microbioma

El estudio del microbioma intestinal es un campo de investigación emergente en la carcinogénesis del CCR-EII. Su interés radica en dos observaciones: primero, está íntimamente relacionado con la inmunidad intestinal por lo que no se pueden entender los procesos inflamatorios subyacentes sin estudiar el microbioma (142,143). Segundo, comparados con controles sanos, los pacientes con EII y CCR-EII presentan perfiles de diversidad, cantidad y composición microbiótica bien distintos, generalmente con tendencia a menor diversidad y mayor abundancia de patógenos sobre comensales – una condición que se ha denominado

‘disbiosis’ (144). Por ejemplo, un estudio antiguo – de hace ya más de veinte años, demostró una abundancia de *Escherichia coli entero-invasivo* en los pacientes con enfermedad de Crohn (145). Otro estudio más reciente encontró una disminución de *Fusobacteria*, entre otros microorganismos, en los CCR-EII comparados con el CCR esporádico (146). Estas observaciones sugieren que el microbioma juega un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades, si bien aún no está claro su papel causal. La evidencia disponible sugiere que el microbioma sano es esencial para preservar la resiliencia contra los microorganismos patogénicos evitando el sobrecrecimiento de los últimos y participando en mantener una barrera intestinal intacta (147). La idea de que la inflamación crónica junto con factores microbianos que alteran la barrera intestinal lleva a la invasión epitelial transcelular y paracelular de patógenos y la consiguiente potenciación del proceso inflamatorio, se ha llegado a conocer como la hipótesis del “suelo común” (147). Ciertas especies de *Campylobacter*, por ejemplo, secretan una proteasa que altera la función de la ocludina – un componente integral de las zónulas ocludens, y favorece así la trans migración paracelular de otros microorganismos (148). En cambio, la hipótesis del “germen alfa” postula que un microorganismo agresivo y prooncogénico causa daño epitelial directo, invade el tejido y desplaza a otras bacterias comensales con efecto protector sobre la mucosa (149). El microbioma sano también es importante para entrenar el sistema inmune intestinal de tal manera que aprenda a no activarse frente a estímulos que bajo condiciones normales no serían patogénicos. Esto lo logra, por ejemplo, a través de la inducción de células T reguladoras o Tregs (tolerancia periférica) (150). Además de generar estímulos proinflamatorios que promueven la carcinogénesis (ver arriba), es posible que los metabolitos y otros productos microbianos afecten directamente la integridad del ADN, la regulación epigenética y el metabolismo de las células epiteliales contribuyendo así a su progresión neoplásica (151). Por último, no se conoce completamente el origen de la disbiosis, aunque es evidente que intervienen múltiples factores. Si bien puede haber una susceptibilidad genética del huésped para ser colonizado por ciertas cepas en lugar de otras, es probable que factores dietéticos y ambientales cobren mayor importancia (143). Algunos de estos factores pueden haber afectado el desarrollo de un microbioma sano ya en fases tempranas de la vida (como el modo del parto, la lactancia, la exposición a antibióticos e infecciones), mientras que la dieta (alta en grasa y baja en fibra) y el estilo de vida (tabaquismo y uso de antibióticos) pueden alterar un microbioma previamente sano. La influencia de la dieta sobre la composición del microbioma tanto a largo como a corto plazo se ha demostrado en varios estudios (152,153). Por otro lado, existe evidencia clínica que una dieta baja en grasas y rica en fibras puede reducir la inflamación y la disbiosis en pacientes con colitis ulcerosa (154). El advenimiento de métodos de secuenciación masiva del ARN ribosomal 16S entre otras técnicas ha hecho posible el estudio del microbioma de forma extensa, rápida y eficiente, y seguirá generando una abundancia de datos en los años por venir (155). La promesa de esta investigación no solo recae en entender mejor la fisiopatología sino también en desarrollar nuevos métodos diagnósticos a base de perfiles de microbioma, por ejemplo para predecir el riesgo de progresión neoplásica (156). Otra posible aplicación sería desarrollar nuevas

terapias para alterar el microbioma mediante antibióticos, probióticos, prebióticos o trasplante fecal con el fin de prevenir o tratar la progresión neoplásica (157). Sin embargo, esta investigación aún está en su infancia.

1.3. Estrategias de Prevención del Cáncer Colorrectal

1.3.1. Generalidades sobre la Prevención en el CCR

“Prevenir es mejor que curar” es un proverbio famoso que se suele atribuir a Erasmo de Róterdam – un filósofo y humanista del siglo XV (1466 – 1536 d.C.). Esta frase hace referencia al hecho de que las medidas que buscan prevenir el desarrollo de una enfermedad no solo evitan el padecimiento causado por la misma sino también por los efectos adversos de las pruebas diagnósticas y terapias que esta conlleva, teniendo en cuenta que, además, en muchos casos de enfermedades cancerígenas estas no logran su curación. Por otro lado, desde Hipócrates de Cos (460 – 370 a.C.), el padre de la Medicina Occidental, la máxima de cualquier intervención médica – sea preventiva, diagnóstica o terapéutica, ha de ser “ayudar y, ante todo, no dañar”. Estos dos principios de la Medicina son perfectamente aplicables a las estrategias de prevención del CCR, las cuales pretenden obviar su aparición y al mismo tiempo evitar sufrimiento innecesario, sea físico o emocional. De hecho, el CCR se considera una enfermedad ideal para ser susceptible de medidas preventivas específicas y organizadas, puesto que, como hemos visto en capítulos anteriores, supone un problema de salud muy prevalente en nuestra sociedad, tiene consecuencias graves sobre la salud de los afectados y se conocen lo suficientemente bien sus causas (genéticas y ambientales) y su historia natural. Ésta consiste en el desarrollo de CCR a través de una lesión premaligna (sea un adenoma, una lesión serrada o una displasia asociada a inflamación crónica) partiendo de una mucosa colónica normal (ver el capítulo previo). Como este proceso tiende a ser lento en el CCR (generalmente más de 10 años en la mayoría de los casos), las medidas preventivas tienen una buena oportunidad para surtir efecto (84). Dicho de otra manera, si el CCR se desarrollase de forma más acelerada y/o sin el paso intermedio de una lesión premaligna como ocurre en otros carcinomas (por ejemplo, el cáncer de pulmón), no habría tiempo para prevenir o detectar y tratar sus formas premalignas, o se tendrían que repetir las intervenciones con intervalos tan cortos que aumentarían inaceptablemente la posibilidad de efectos adversos y el consumo de recursos con consecuencias nefastas para el bienestar de los pacientes y los sistemas sanitarios. Por último, para el CCR existen medidas preventivas efectivas y con buen perfil de seguridad a los tres niveles de prevención: primaria, que consiste en eliminar el riesgo antes de que aparezcan lesiones, por ejemplo a través de la modificación del estilo de vida; secundaria, que consiste en detectar lesiones precancerosas o cáncer en fase inicial cuando aún es potencialmente curable a través del cribado de poblaciones de medio y alto riesgo mediante pruebas diagnósticas; y terciaria, que consiste en evitar el desarrollo de nuevas lesiones o cáncer mediante la vigilancia (158,159). Mientras que toda la población es susceptible de prevención primaria, la prevención secundaria se aplica en función de la estratificación del riesgo de CCR y esta se determina a base de factores personales, familiares

y, en algunos casos, genéticos y moleculares (160). La población de riesgo bajo es aquella menor a 50 años, sin historia personal ni familiar de neoplasia colorrectal y sin antecedente personal de condiciones que predispongan a su desarrollo. Hoy en día, en esta población no está indicado el cribado. La población de riesgo promedio es aquella mayor de 50 años y sin historia personal ni familiar de CCR y supone el grupo diana del cribado poblacional. Por último, los individuos con historia personal o familiar de neoplasia colorrectal o con condiciones genéticas que incrementen el riesgo de CCR forman el grupo de riesgo alto. Entre estas condiciones se hallan el síndrome de Lynch, la poliposis adenomatosa familiar y otras formas de poliposis adenomatosa y hamartomatosa así como el CCR familiar, el CCR tipo X, el síndrome de poliposis serrada y la colitis ulcerosa de larga evolución (160). Puesto que el riesgo acumulado de CCR y la velocidad de su desarrollo varía notablemente entre las distintas entidades dentro de este grupo, se han establecido recomendaciones de cribado y vigilancia específicas para cada una de ellas. Comúnmente, se suele empezar el cribado a edades más jóvenes y realizar en unidades especializadas. La discusión de las recomendaciones de todas las formas de alto riesgo no está al alcance de esta tesis por lo que se refiere a las guías nacionales e internacionales de práctica clínica publicadas: de la Asociación Española de Gastroenterología (AEG, 2018) (160); la Sociedad Europea de Endoscopia Gastrointestinal (ESGE, 2019) (161,162); la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO, 2015) junto con la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, 2015) (163); la US Multi-Society Task Force (US-MSTF, 2014) (164); la Asociación Canadiense de Gastroenterología (CAG, 2018) (165); y la Sociedad Británica de Gastroenterología (BSG, 2020) (166). La tabla 2 da un resumen simplificado de la Asociación Española de Gastroenterología (AEG) y la Sociedad Europea de Endoscopia Gastrointestinal (ESGE), las cuales son la referente para las recomendaciones en el territorio español. A continuación, se discutirán el potencial y las limitaciones del cribado y seguimiento específico en las dos condiciones de alto riesgo que son tema de esta tesis: el síndrome de poliposis serrada y el CCR asociado a la colitis ulcerosa.

Síndrome		Edad de Inicio del Cribado (años)		Periodicidad	
CCR esporádico		50 ¹		Cada 2 años ¹	
Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) ²		10-12 (AEG)	12-14 (ESGE)	Cada 1-2 años (AEG) ³	Cada 1-2 años (ESGE) ³
Poliposis Adenomatosa Familiar atenuada (PAFa) ²		18-20 (AEG)	12-14 (ESGE)	Cada 2 años (AEG) ³	
Poliposis Adenomatosa asociada a <i>MUTYH</i> (PAM) ²		18-20 (AEG)	18 (ESGE)	Cada 2 años (AEG) ³	
Síndrome de Lynch ⁴		20 (AEG)	25 (<i>MLH1/MSH2</i>) ⁴ 35 (<i>MSH6/PMS2</i>) ⁴	Cada 1-2 años (AEG)	Cada 2 años (ESGE)
Poliposis Adenomatosa asociada a la lectura de Prueba de la Polimerasa (PPAP)		18-20 (AEG)		Cada 2 años (AEG) ³	
Poliposis asociada al gen <i>NTHL1</i>		18-20 (AEG)		Cada 2 años (AEG) ³	
Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ)		8 (si normal, siguiente a los 18) (AEG y ESGE)		Cada 2-3 años (AEG)	Cada 1-3 años (ESGE)
Síndrome de Poliposis Juvenil (SPJu)		15 (AEG)	12-15 (ESGE)	Cada 2-3 años (AEG)	Cada 1-3 años (ESGE)
Síndrome de Cowden		35 (AEG)		Cada 3-5 años (AEG)	
Síndrome de Poliposis Mixta Hereditaria (SPHM)		La AEG y la ESGE no lo especifican. (hay muy pocas familias afectas, la mayoría judías) ⁵		La AEG y la ESGE no lo especifican. ⁵	
Síndrome de Poliposis Serrada (SPS)		40 (o 10 años antes del diagnóstico del familiar afecto más joven) (AEG)	45 para FPG (ESGE)	Si normal, cada 5 años (AEG y ESGE)	
				Si SPS, cada 1-3 años según los pólipos detectados.	Si SPS, cada 1-2 años según los pólipos detectados.
CCR familiar tipo X		35 (o 10 años antes del diagnóstico del familiar afecto más joven) (AEG)		Cada 3-5 años (AEG)	
CCR familiar ⁶	Definición AEG: solo si ≥2 FPG	Cumplen la definición: 40 años (o 10 años antes del diagnóstico del familiar afecto más joven) No cumplen la definición: a los 50 años (igual que cribado poblacional)		Cumplen la definición: cada 5 años No cumplen la definición: cada 10 años (o TSOHi bianual)	
	Definición ESGE: si ≥2 FPG o si al menos 1 FPG <50 años				

Tabla 2 | Recomendaciones de la AEG (2018) y ESGE (2019) sobre el Cribado y la Vigilancia del CCR esporádico y los Síndromes de Alto Riesgo

1, La AEG recomienda el cribado del CCR esporádico mediante el TSOHi y realizar colonoscopia en caso de ser positivo. Si se ha hecho una colonoscopia directa y esta es negativa, la AEG recomienda continuar con TSOHi bianual o colonoscopia cada 10 años. **2,** La AEG y la ESGE recomiendan además iniciar el cribado de cáncer de duodeno al debut de los adenomas en colon o a los 25-30 años con una periodicidad de cada 5 años. Si se detectan adenomas duodenales, recomiendan intervalos de vigilancia según el estadio de Spigelman. **3,** Si se detectan adenomas en la colonoscopia, recomiendan la vigilancia anual. **4,** Actualmente, en la mayoría de los centros de España se están siguiendo las recomendaciones más actualizadas de la ESGE. **5,** Ziai J, et al. recomiendan comenzar el cribado en portadores de la mutación a los 18 años o 5 años antes del diagnóstico del familiar afecto más joven, y si negativo, realizar TSOHi anual y colonoscopia cada 5 años: *Genet Res (Camb)* (2016) (167). **6,** FSG y FTG no entran en esta definición independientemente de su número y edad. **NOTA:** Esta tabla solo hace referencia al cribado y la vigilancia del CCR. Sin embargo, algunos síndromes también incrementan el riesgo para cánceres de otros órganos que requieren pruebas de cribado adicionales que no se mencionan aquí. Abreviaturas: FPG, familiar de primer grado; FSG, familiar de segundo grado; FTG, familiar de tercer grado; TSOHi, test de sangre oculta en heces inmunológico.

1.3.2. Vigilancia en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La EII se asocia con un incremento de riesgo de CCR y este se correlaciona con la duración, la extensión, la gravedad y otros factores (ver primer apartado de la introducción). Es por ello que prácticamente todas las sociedades científicas internacionales y nacionales recomiendan la vigilancia de pacientes con EII en función de estas características (fig. 14): la Asociación Americana de Endoscopia Gastrointestinal (ASGE, 2015) (168), la Organización Europea de la Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (ECCU, 2017) (109), el Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU, 2021) (169) y la Asociación Española de Gastroenterología (AEG, 2018) (160). Mientras que las recomendaciones concretas pueden variar entre las diferentes guías, todas concuerdan en dos aspectos esenciales: primero, el control sostenido de la actividad inflamatoria mediante las terapias disponibles es una medida eficaz de la prevención primaria (107); y segundo, las estrategias de vigilancia actuales como prevención secundaria tienen como objetivo identificar y tratar la displasia porque supone la lesión premaligna del CCR asociado a la colitis. En cuanto a la prevención primaria, no existe ningún estudio controlado con placebo que haya evaluado la eficacia de las diferentes terapias, ya que sería poco ético no ofrecer ningún tratamiento antiinflamatorio a los pacientes afectados. Sin embargo, se ha visto que el tratamiento con 5-ASA en la colitis ulcerosa es capaz de alcanzar la curación mucosa y además presenta una actividad antineoplásica (170,171). Un metaanálisis de 31 estudios observacionales del 2017 concluyó que el tratamiento con 5-ASA podría tener un efecto quimiopreventivo sobre el desarrollo de la neoplasia colorrectal en la EII (172). Sin embargo, un reciente metaanálisis de cinco estudios del 2021 en pacientes con displasia de bajo grado no encontró una disminución estadísticamente significativa de su progresión hacia la neoplasia avanzada con el uso de 5-ASA ni con tiopurinas (173). En cuanto a la prevención secundaria, aunque también solo hay estudios de series de casos y de cohortes, la mayoría de las sociedades recomiendan realizar una colonoscopia cada uno a cinco años a partir de los ocho a diez años del inicio de la enfermedad, a menos que existan factores de riesgo específicos como la coexistencia de una colangitis esclerosante primaria. Las dos cohortes antiguas más grandes hasta la fecha son la 'PALGA' de Países Bajos (2009) (174) y la del St. Mark's Hospital (2015) (107). La primera demostró una supervivencia por CCR a los cinco años del 100% en el grupo con vigilancia frente al 74% en el grupo sin vigilancia. El segundo demostró que la tasa de CCR avanzados y de CCR de intervalo han disminuido significativamente tras la introducción de la vigilancia mientras que la detección de displasias y CCR en fases precoces han aumentado (por un factor de 2,5). Además, existe evidencia preliminar que la vigilancia endoscópica podría ser coste efectiva (175). No obstante, aún falta evidencia inequívoca sobre una serie de cuestiones prácticas. Por ejemplo, sobre los intervalos de vigilancia, la utilidad de las técnicas endoscópicas avanzadas para aumentar la detección de displasia, la indicación y la mejor estrategia quirúrgica, y, sobre todo cuál sería el manejo más oportuno en caso de detectar una displasia. Basándose en la observación que el riesgo de CCR se asocia a ciertos factores de riesgo, las guías de práctica clínica europeas recomiendan ajustar los intervalos de

vigilancia tras estratificación del riesgo (fig. 14). La AEG, por ejemplo, recomienda realizar colonoscopias cada uno a dos años en los pacientes con factores de alto riesgo: pacientes que hayan tenido una colitis extensa (>50% del colon), actividad grave, estenosis o displasia en los últimos cinco años, una historia familiar de CCR menor a 50 años o que presenten una colangitis esclerosante primaria concomitante. En caso de una colitis extensa, pero de actividad moderada-leve, la presencia de pseudopólipos y/o una historia familiar de CCR mayor a 50 años, la AEG recomienda un intervalo de dos a tres años, y en los casos sin factores de riesgo un intervalo de cada cinco años (160). A pesar de que esta estrategia parece disminuir el riesgo de CCR, basarse solamente en la endoscopia es claramente subóptimo, ya que existen varias limitaciones a la hora de detectar y diagnosticar la displasia. En primer lugar, sus bajas tasas de detección durante la colonoscopia (176,177). De hecho, en piezas de colectomía realizada por haber detectado una displasia de alto grado se ha detectado un alto número de neoplasias sincrónicas (178). Además, los cánceres de intervalo son más frecuentes en los casos asociados a la EII en comparación con los casos esporádicos (15% vs. 5,8%, respectivamente, $P<0,001$) (179,180). Estas dos observaciones se deben a lesiones displásicas no detectadas o no reseadas completamente. Similar a las lesiones serradas en el SPS, las lesiones displásicas a menudo se escapan de la detección endoscópica porque la mayoría son planas, sutiles, menores a 10 mm y/o asientan en una mucosa con cambios inflamatorios crónicos dificultando la diferenciación de estas de la displasia (fig. 12) (111). Por este motivo, durante mucho tiempo se recomendó la toma de biopsias aleatorias múltiples cada 10 cm de colon para identificar posibles focos de displasia invisible. Sin embargo, esta estrategia no solo conlleva una enorme carga para los servicios de Anatomía Patológica² sino también tiene un bajo rendimiento siendo tan solo una entre mil biopsias positiva para displasia (181). Por eso, se ha abandonado esta recomendación a favor de realizar solo biopsias dirigidas de lesiones sospechosas de displasia, siempre y cuando se realice con la técnica de pancromoendoscopia y en ausencia de condiciones que puedan impedir una inspección detallada de toda la mucosa (por ejemplo, por la presencia de múltiples pseudopólipos, una marcada desestructuración del colon o ante la sospecha de displasia multifocal invisible) (160). La pancromoendoscopia es una técnica que utiliza un colorante azul para teñir la superficie mucosa y así aumentar el contraste de las criptas. Mientras que la utilidad de las técnicas endoscópicas avanzadas (aún) es motivo de debate en el SPS, existe evidencia convincente que la pancromoendoscopia convencional en la vigilancia de la EII es superior a la luz blanca – incluso en manos inexpertas y con endoscopios de alta definición (111). Asimismo, la pancromoendoscopia con biopsias dirigidas ha demostrado ser más coste-efectiva que la endoscopia con luz blanca convencional y biopsias aleatorias (175). Aunque las GPC aún no recomiendan la cromoendoscopia virtual, ya hay evidencia que sugiere que al menos no es inferior a la cromoendoscopia convencional (21,5% vs. 21,1%) pero tiene la posible ventaja de un acortamiento del tiempo de exploración (de unos siete minutos en un estudio controlado prospectivo multicéntrico) (182). Otro reto en el diagnóstico de la

² Una recomendación de realizar biopsias de los cuatro cuadrantes cada 10 cm resultaría en una media de 30 a 40 biopsias por paciente y exploración.

displasia es la poca concordancia entre observadores – tanto entre endoscopistas como entre especialistas de Anatomía Patológica – para distinguir las lesiones displásicas de las alteraciones morfológicas asociadas a la inflamación (105). Por esta razón, las biopsias clasificadas como “indefinido para displasia” son muy frecuentes por lo que las sociedades recomiendan que las lesiones sean revisadas por otro/a patólogo/a y que al menos uno/a de ellos/as tenga experiencia en patología del aparato digestivo. En un estudio holandés, esta estrategia ha demostrado disminuir de forma notable la progresión a neoplasia avanzada en el caso de las lesiones indefinidas (de un 21% a un 5% a los cinco años), mientras que la progresión incrementó en las de bajo grado (110). Por otro lado, la pobre concordancia interobservador también es aparente a la hora de distinguir la displasia de bajo grado de la de alto grado (183). Por último, la dificultad para distinguir fiablemente la displasia asociada a colitis de los adenomas esporádicos con displasia (184,185).

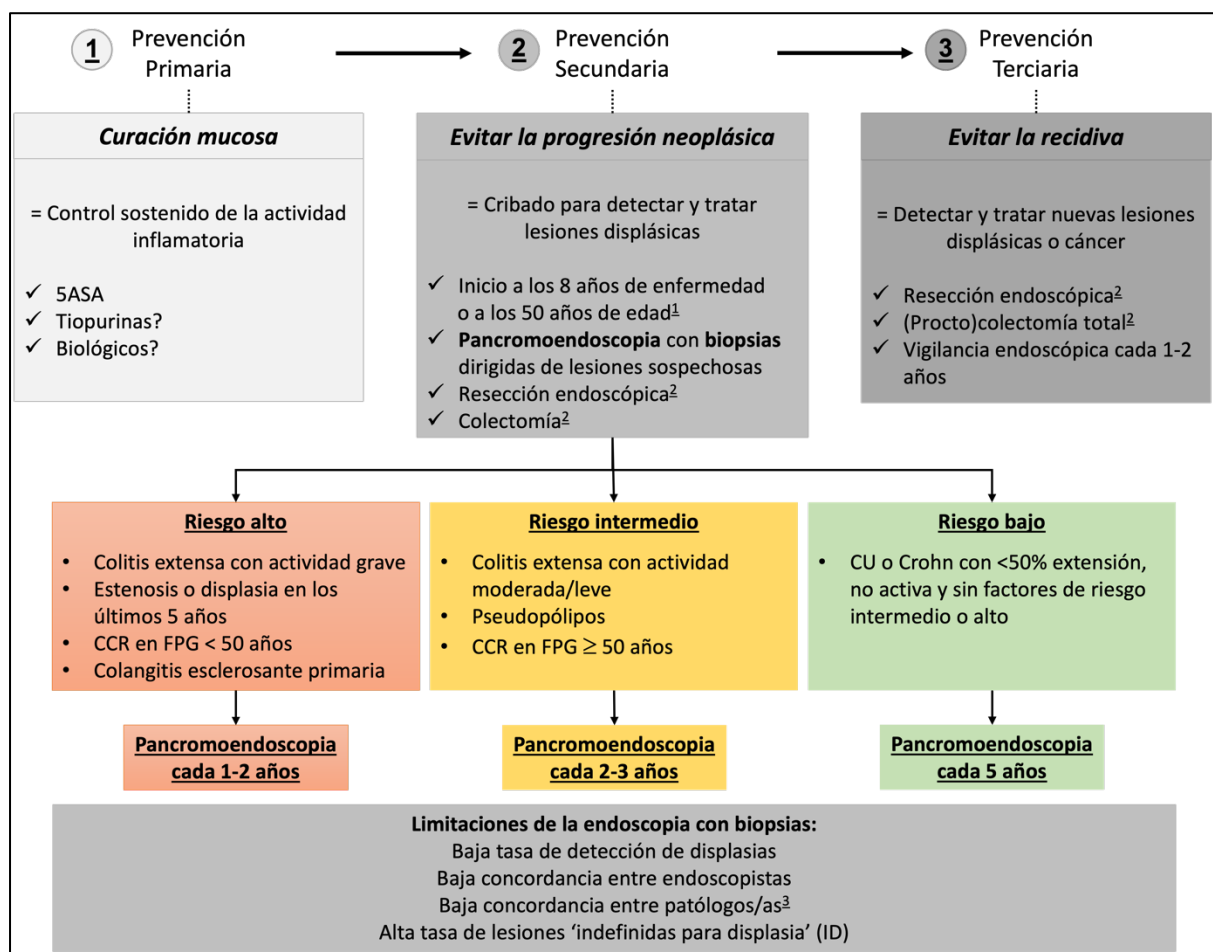


Figura 14 | Prevención del CCR asociado a la EII (simplificado) y estratificación del riesgo para los intervalos del cribado mediante pancromoendoscopia

Recomendaciones de la AEG. **1**, Lo que ocurra primero. **2**, El tamaño y número de las lesiones, la viabilidad de una resección en bloque y completa, y la presencia de displasia de alto grado o cáncer en la lesión o la mucosa adyacente definirán el tipo de tratamiento definitivo. **3**, Para diferenciar displasia de bajo grado, displasia de alto grado y lesiones reactivas. Abreviaturas: FPG, familiar de primer grado; CU, colitis ulcerosa. Fuente: elaboración propia inspirada por Cubiella J, et al. *Gastroenterol Hepatol* (2018).

Las dificultades para detectar y diagnosticar con precisión la displasia como lesión premaligna del CCR asociado a la colitis y las desventajas de la colonoscopia como método invasivo y costoso han llevado a la búsqueda de biomarcadores alternativos, más robustos, objetivos y mínimamente o no invasivos (186). La idea es disponer de biomarcadores en heces, sangre o biopsias rectales que permitan una mejor estratificación del riesgo para presentar displasia o cáncer. En este escenario solo se haría una colonoscopia completa en caso de positividad del biomarcador. En cambio, si el resultado fuera negativo, se continuaría con el cribado anual mediante la determinación del biomarcador poco o no invasivo. Para poder evitar la colonoscopia como prueba de cribado, los biomarcadores tienen que ser muy sensibles para detectar la displasia y al mismo tiempo lo más específico posible para evitar exploraciones innecesarias. Dos aspectos de la fisiopatología del CCR asociado a la colitis han despertado gran esperanza en el desarrollo de tales biomarcadores. Primero, se han detectado alteraciones moleculares asociadas a la displasia antes de la aparición de displasias macroscópicamente visibles siendo potenciales biomarcadores precoces de la progresión neoplásica. Por ejemplo, la inestabilidad cromosómica y las variantes patogénicas en el gen *TP53* se asocian a la progresión neoplásica en los pacientes con colitis ulcerosa, son eventos tempranos en la carcinogénesis y potencialmente detectables en sangre (121,187,188). Sin embargo, si bien el CCR asociado a la colitis se distingue molecularmente del CCR esporádico en que el último solo presenta variantes patogénicas en el *TP53* en fases tardías, es obvio que no deja de ser un marcador poco específico para el CCR asociado a la colitis (188). De la misma manera es evidente, que la prueba de sangre oculta en heces – muy valiosa en el cribado del CCR esporádico, no sirve para la detección precoz de cáncer en los pacientes con EII, ya que la mucosa inflamada y friable ocasionaría demasiados falsos positivos. Segundo, se han detectado alteraciones moleculares que están presentes tanto en biopsias de lesiones neoplásicas como en las de tejido distante no-neoplásico, pero no en pacientes sin presencia de displasia o cáncer. Similar al SPS, esta observación fortalece la hipótesis de que existe un defecto de campo que predispone a la progresión neoplásica también en la colitis ulcerosa. Por ejemplo, en un estudio el promotor del gen *EYA4* se encontró hipermetilado en mucosa de lesiones neoplásicas y no-neoplásicas de pacientes con neoplasia, pero no en pacientes sin evidencia de la misma (189). Además, en un estudio que analizó la expresión génica en biopsias rectales de pacientes que presentaron una progresión neoplásica comparado con los que no la presentaron, se describió un panel de veinte genes que era capaz de distinguir los pacientes con cáncer con una precisión del 83% y tenía un valor predictivo negativo del 100% (190). Aunque han sido estudios con un número reducido de pacientes y aún faltan estudios de validación, es evidente que abren la puerta a buscar biomarcadores pronósticos en biopsias rectales sin evidencia de displasia. Los microARN son candidatos ideales para biomarcadores debido a su pequeño tamaño, estabilidad en muestras biológicas, disponibilidad en muestras de sangre (microARN circulantes), capacidad de regular cientos de ARNm, y su número total relativamente pequeño en comparación con los ARNm (fig. 13). Es más, los microARN se han relacionado con procesos patogénicos como las vías de señalización inflamatoria, la transición epitelio-mesénquima, las células madre cancerosas y la metástasis

(191–193). En el CCR asociado a la colitis, la evidencia sobre el papel de los microARN en la inflamación y la carcinogénesis es menos abundante en comparación con el CCR esporádico, pero varios estudios han encontrado resultados preliminares prometedores (137,194,195). Aunque la mayoría de los estudios anteriores se centraron en patrones de expresión específicos de la enfermedad tanto en la colitis ulcerosa como en la enfermedad de Crohn, algunos han identificado microARNs expresados diferencialmente en el CCR asociado a la colitis (138,196–198). No obstante, estos estudios tienen varias limitaciones: un tamaño muestral pequeño, la ausencia de validación en cohortes independientes, la falta de inclusión de la displasia como lesión premaligna, y la ausencia de comparación del perfil de expresión con el CCR esporádico. A pesar del creciente conocimiento de los microARN como reguladores tanto en la inflamación mantenida y la carcinogénesis asociada a la inflamación, estos procesos aún no se entienden en profundidad y se necesita más investigación para encontrar biomarcadores para el uso clínico, por lo que este ha sido uno de los principales objetivos de esta tesis.

1.3.3. Vigilancia en el Síndrome de Poliposis Serrada

La Evolución de las GPC sobre la Prevención del SPS

En el primer capítulo de la introducción se ha descrito que el SPS se diagnostica en aproximadamente una de cada 200 colonoscopias de cribado debidas a una prueba de sangre oculta en heces positiva (48,199). Aunque era bien conocido que algunos pacientes presentaban múltiples y/o grandes pólipos hiperplásicos y, de hecho, se describió este síndrome hace ya más de cuarenta años, no se recomendó un seguimiento endoscópico específico hasta al menos la primera década de los años 2000, dado que se consideraba que su lesión de base no tenía potencial de malignización (46,200,201). No obstante, al observar una prevalencia de CCR mucho mayor en pacientes con SPS comparado con la población general y una incidencia acumulada durante su seguimiento también mayor (hasta el 7% en algunas series), se empezó a reconocer el papel de las lesiones serradas como lesiones preneoplásicas y recomendar su tratamiento y vigilancia de forma más estrecha (50,202–204). Además, se empezó a considerar el adenocarcinoma serrado como una nueva subentidad fenotípica y molecular de CCR y su relación con las lesiones serradas como sus posibles precursoras (88,101). Como consecuencia, en 2010 la OMS definió los primeros criterios unificados para diagnosticar el SPS (fig. 15) lo cual ayudó a estandarizar el manejo y facilitar la investigación sobre esta nueva entidad (205). En 2012, un panel de expertos/as publicó la primera GPC que recomendó la resección de todas las lesiones serradas. Esto incluía también a los pólipos hiperplásicos con la única excepción de los PH menores a 4 mm en recto-sigma. En aquellos casos diagnosticados con CCR o en los que no se consiguiera la resección endoscópica de todas las lesiones serradas por su multiplicidad o difícil localización, se recomendaba la resección quirúrgica (55). Estas medidas suponen el primer paso en el manejo del SPS a la que se denomina fase de control de pólipos o *'clearance'*, en inglés.

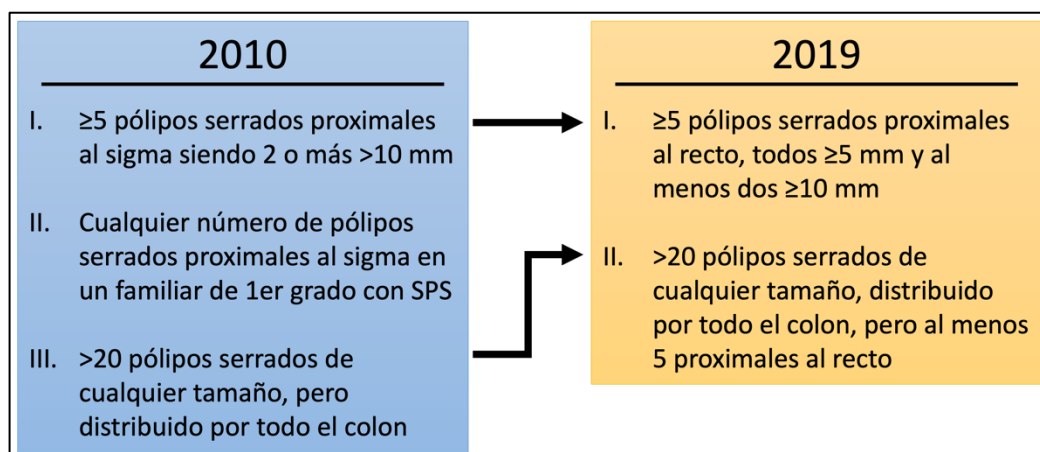


Figura 15 | Definición antigua y actual del Síndrome de Poliposis Serrada

El panel de expertos/as también recomendó el seguimiento endoscópico anual de estos pacientes siendo este el segundo paso en el manejo del SPS y la fase de vigilancia o *'surveillance'*, en inglés. Además, se sugirió empezar el cribado de los familiares de primer grado mediante colonoscopia a partir de los cuarenta años o diez años antes del diagnóstico de SPS en el familiar afecto más joven, continuando con intervalos de cinco años o menos en función de la presencia, número y tamaño de los pólipos serrados detectados, si bien los autores ya advirtieron de que la base científica aún era débil para esta recomendación (55). Estos consejos aumentaron notablemente el número de colonoscopias en estos pacientes – una prueba no exenta de riesgos y con baja-moderada aceptación por parte de la población. Además, durante los años subsiguientes se vio en los estudios prospectivos y/o multicéntricos que la gran mayoría de los CCR se diagnostica en el momento del diagnóstico de SPS y que su incidencia durante el seguimiento era menor que la anteriormente descrita (51–53,206). Aunque es posible que las tasas de incidencia más reducidas se aproximen mejor a la realidad debido a la mejor calidad de diseño de estos estudios más recientes, también es verdad que se realizaron en centros de tercer nivel con endoscopistas bien concienciados de esta entidad y bien entrenados en la detección y resección de las lesiones serradas llevando a un mejor nivel de control del síndrome. Por otro lado, se vio que la agregación familiar era poco frecuente y el estudio prospectivo de Hazewinkel y colegas del 2015 demostró un bajo rendimiento de la colonoscopia de cribado en FPG para detectar CCR (no se detectó ningún caso en 77 FPG de 36 pacientes índices con SPS) (63). Como consecuencia, se propuso que una vigilancia anual para los FPG con alguna lesión serrada (antiguo criterio II de la OMS) era excesiva y que sería mejor individualizar la estrategia en función del número, tamaño y patología de las lesiones encontradas (207). Además, en 2019 el antiguo criterio II quedó obsoleto en la nueva definición del SPS de la OMS (fig. 15). También era evidente que el SPS presenta fenotipos muy variables con riesgos de CCR bien diferentes. Así, la combinación de los criterios I y III pareció tener mayor riesgo de desarrollar neoplasias avanzadas que el criterio I solo y este mayor que el criterio III solo (53,208,209). Adicionalmente, se identificaron factores de riesgo de desarrollar CCR independientes como son la presencia de varias lesiones proximales (es decir, al ángulo esplénico), la presencia de lesiones mayores de

10 mm y/o con displasia y la presencia de adenomas avanzados (52,209). En base de estas observaciones y la reducida incidencia durante la vigilancia (*surveillance*), siempre y cuando se hayan erradicado todas las lesiones serradas en la primera fase (*clearance*), se ha propuesto que se pueden relajar los intervalos de vigilancia y personalizar en función del fenotipo concreto (53). No obstante, aun faltan variables útiles para identificar aquellos pacientes con bajo riesgo de lesiones incidentes.

En este sentido, a día de hoy las GPC están sujetas a la actualización frecuente basándose en la nueva evidencia científica. La Sociedad Europea de Endoscopia Gastrointestinal (ESGE, 2019) tiene publicada la guía más reciente y recomienda realizar la siguiente colonoscopia en un año en presencia de una o más lesiones avanzadas (definidas como mayores de 9 mm, cualquier tipo de displasia en una LS, displasia de alto grado en un adenoma, componente vellosa en un adenoma o un adenoma serrado tradicional), cuando hay cinco o más lesiones no avanzadas o cuando se ha tenido que realizar una resección quirúrgica por CCR. En ausencia de estos factores, la ESGE recomienda un intervalo de dos años (161). La ESGE sigue recomendando el cribado en los FPG de afectos por SPS, empezando a los 45 años y con una periodicidad de cinco años (o menos en función de los pólipos encontrados). En vista de la baja evidencia de riesgo de CCR en los FPG, en nuestro centro (Hospital Clínic de Barcelona) hemos decidido en el protocolo actual no realizar seguimiento endoscópico en aquellos FPG sin diagnóstico de SPS ni lesión serrada en la colonoscopia de cribado y derivarlos al programa de cribado poblacional. Aparte de que aún faltan estudios sobre su coste-efectividad, a día de hoy existen varias otras cuestiones sin resolver en el cribado y seguimiento del SPS. Primero, aquellos pacientes que son potenciales candidatos a tratamiento quirúrgico, sea por imposibilidad de control endoscópico de las lesiones serradas o por haber detectado un cáncer invasivo, no está claro cuál es la estrategia quirúrgica más oportuna (proctocolectomía, colectomía total o segmentaria) y tampoco hay datos sobre la efectividad del seguimiento endoscópico del remanente rectal o colónico postcirugía. En un pequeño estudio retrospectivo de 48 pacientes con una mediana de seguimiento de cinco años post-colectomía (sub)total no se detectó ningún cáncer y el riesgo de neoplasia avanzada era inferior al veinte por ciento, lo cual hace cuestionar la utilidad de unos intervalos de vigilancia estrechos en estos pacientes (206).

El tiempo del fin de seguimiento es otro tema no resuelto. No existen datos específicos para el SPS, pero para el cribado de CCR esporádico se ha estimado que la edad óptima para suspenderlo se encuentra entre los 75 y 85 años, ya que a partir de esta edad otras causas de muerte superan aquella por CCR (210). Basándose en estas estimaciones, la ESGE recomienda en su GPC del 2016 sobre el seguimiento post-polipectomía un fin de vigilancia entre 75 y 85 años, individualizando cada caso en función de la calidad y expectativa de vida del paciente, sus comorbilidades y los hallazgos en la última colonoscopia. La ESGE repite esta declaración en su actualización del 2020 y sin concretar sobre el SPS por falta de nueva evidencia (211,212).

El Manejo de los *oligo-SPS* o *SPS-like*

También falta evidencia sobre el manejo óptimo de pacientes que presentan una única lesión serrada de gran tamaño (≥ 20 mm), o varias lesiones serradas, pero sin cumplir los criterios de la OMS para SPS. Esta situación se ha denominado *oligo-SPS* o *SPS-like*. Un estudio de Australia del 2018 sugirió que el número de pólipos y las características clínicas no diferían entre los pacientes con SPS y *oligo-SPS* y que la frecuencia de displasia en las lesiones de mayor tamaño era similar en ambos grupos. Por eso, concluyeron que los pacientes con *oligo-SPS* probablemente podrían beneficiarse de la misma vigilancia. Sin embargo, este estudio fue unicéntrico, retrospectivo y solo incluyó a 67 pacientes con SPS, 53 pacientes con una lesión serrada solitaria ≥ 20 mm y 26 con *oligo-SPS* (213). También hay que enfatizar que una gran parte de pacientes con *oligo-SPS* podría ser en realidad un SPS no diagnosticado debido a lesiones no detectadas. De hecho, en un estudio prospectivo, el diagnóstico de SPS se triplicó en la colonoscopia de control un año después en los pacientes con alguna lesión serrada en la primera colonoscopia (49). Esta falta de detección de lesiones y, como consecuencia, los diagnósticos perdidos de SPS es *de facto* el mayor problema en el manejo de estos individuos hoy en día. Por ello, similar a lo que está publicado para mejorar la detección de adenomas, para conseguir una buena tasa de detección de lesiones serradas es imprescindible una alta calidad de la técnica endoscópica que incluya una correcta preparación del colon, un tiempo suficiente de retirada (superior a siete minutos) y un adecuado nivel de entrenamiento del endoscopista (214,215). En comparación a los adenomas, las lesiones serradas presentan unas características morfológicas y topológicas que añaden una dificultad adicional para su detección, puesto que suelen ser planas, pálidas, a menudo cubiertas por moco y localizadas en colon derecho, de tal forma que incluso lesiones grandes pueden pasar desapercibidas (fig. 4) (216,217). Como consecuencia, la tasa de cánceres de intervalo, definido como el cáncer que ocurre tras una colonoscopia sin cáncer, es especialmente alta en estos pacientes. Así, en un estudio poblacional de Países Bajos, cada punto de aumento de la tasa de detección de lesiones serradas (TDLS), disminuye el riesgo de un cáncer de intervalo en un 7%, por lo que los autores concluyeron que la implementación de la monitorización de la TDLS (junto con la tasa de detección de adenomas) podría optimizar la prevención del CCR (218). Sin embargo, faltan datos para definir la TDLS óptima, ya que existe una gran heterogeneidad en la prevalencia de las lesiones serradas entre los diferentes estudios debido a las diferentes definiciones de estas en el pasado. En una revisión sistemática y metaanálisis reciente se ha estimado una prevalencia de lesiones serradas sésiles del 2% y de lesiones serradas proximales del 10% en la población de riesgo medio (219).

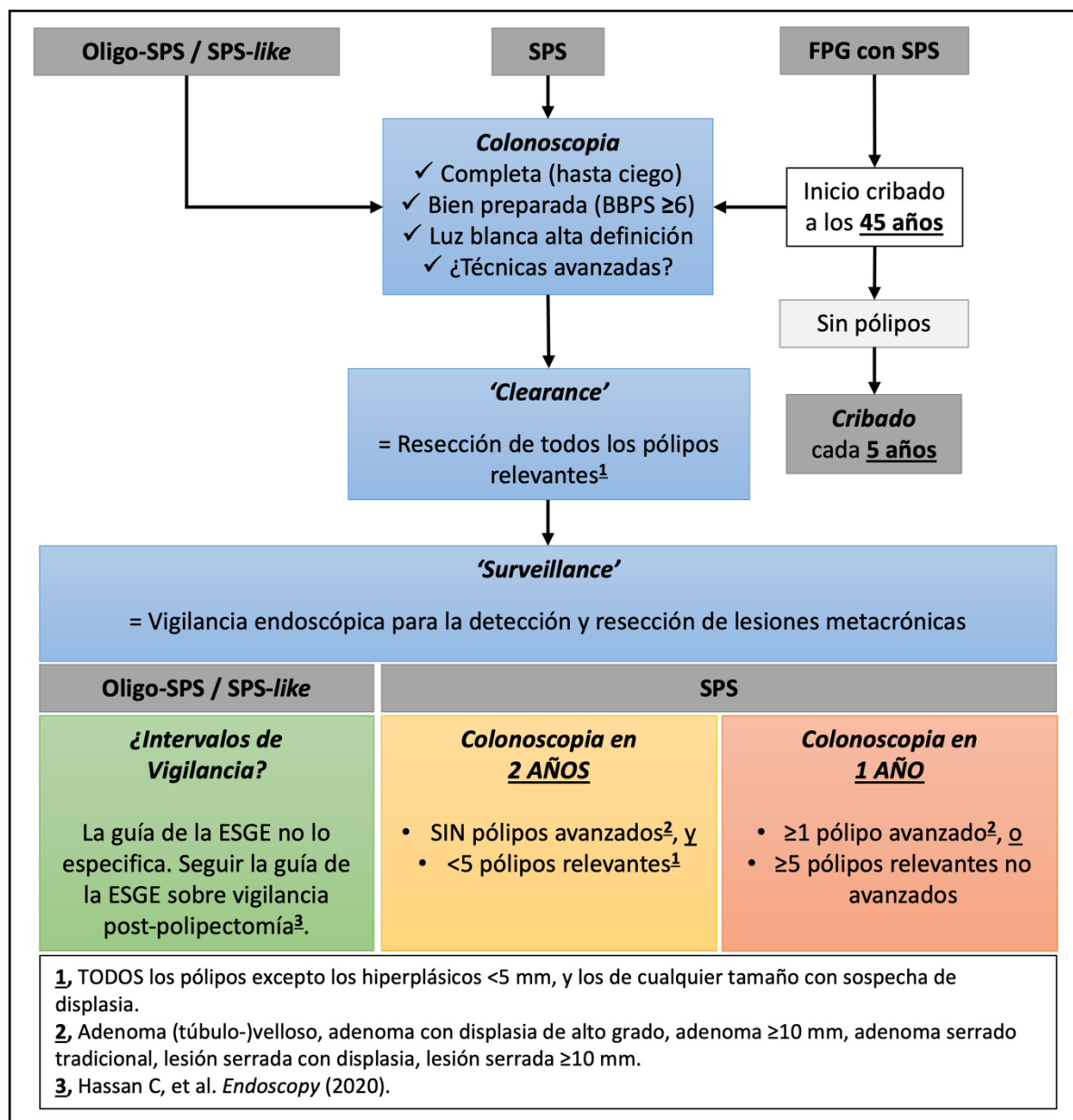


Figura 16 | Manejo del SPS y FPG con SPS según la guía de la ESGE (2019)

Gráfica: elaboración propia. Referencia de la guía: Van Leerdam M et al. *Endoscopy* (2019).
 Abreviaturas: BBPS, Boston Bowel Preparation Scale; ESGE, Sociedad Europea de Endoscopia Gastrointestinal; FPG, familiar de primer grado; SPS, Síndrome de Poliposis Serrada.

Las Técnicas Endoscópicas Avanzadas para Mejorar la Detección de Lesiones Serradas

Con la intención de aumentar la detección de las lesiones serradas se han empezado a investigar varias técnicas endoscópicas avanzadas para mejorar su visualización, pero la evidencia sobre su utilidad aun es contradictoria. Un estudio español multicéntrico encontró que la pancromoendoscopia mejora significativamente la tasa de detección de lesiones serradas (TDLS) proximales al sigma comparado con luz blanca y alta definición (0,40 vs. 0,24, $P=0,001$) (220). Otro estudio aleatorizado y controlado reciente demostró que el uso de una solución con ácido acético en lugar de una solución salina normal para irrigar el colon durante

la endoscopia también podría mejorar la detección de lesiones serradas sésiles (221). En cuanto a las técnicas de cromoendoscopia virtual, la cual se basa en la modificación digital post-procesamiento de la imagen e incrementa el contraste de la superficie mucosa y/o de estructuras vasculares en tiempo real, un metaanálisis del 2019 comparó el NBI (Olympus), el iScan (Pentax), el BLI y el LCI (ambos de Fujifilm) con luz blanca y alta definición, y solo demostró superioridad para el NBI (222). Este resultado fue corroborado en otro metaanálisis del 2020 que incluyó seis estudios con NBI (223). Por otro lado, un estudio prospectivo reciente del 2022 ha demostrado que LCI también es capaz de detectar más lesiones serradas, mientras que otro estudio del 2021 concluyó que el NBI no mejoraba la tasa de detección de lesiones serradas, siempre y cuando las endoscopias fueran realizadas por endoscopistas experimentados (224,225). Además, otro estudio aleatorizado y controlado que comparó el NBI con luz blanca y alta definición tampoco demostró mayores tasas de detección en pacientes que habían tenido alguna lesión serrada previa pero sin cumplir los criterios para el SPS (226). Existe evidencia de al menos tres metaanálisis, que sugiere que las técnicas que usan agua (recambio de agua o sumersión en agua) en lugar de gas para la exploración del colon podrían favorecer la detección de lesiones serradas (223,227,228). El hecho de que las lesiones serradas a menudo son planas o plano-elevadas dificulta su detección, particularmente cuando se encuentran detrás de un pliegue o en un ángulo. Para no perder estas lesiones, el endoscopista ha de adoptar una maniobra de entrar y salir varias veces por cada pliegue idealmente aplanándolo mediante la punta del endoscopio. Sin embargo, estas maniobras aumentan considerablemente el tiempo de exploración. Por eso, la industria ha desarrollado un amplio abanico de complementos que se conectan en la punta del endoscopio (ingl. *add-on*) que ayudan a aplanar pasivamente los pliegues durante la retirada del endoscopio. Un metaanálisis del 2020 analizó los resultados de doce estudios con diferentes *add-ons* (endocap: 2; endocuff: 3; endocuff vision: 3; endorings: 2; G-EYE: 1; Amplif-EYE: 1) y encontró que estos complementos podrían ser de utilidad para mejorar la detección de las lesiones serradas, particularmente el *endocuff vision* con el que observaron casi una duplicación en la detección de las mismas (RR=1,88; 95%IC 1,11 – 3,19(223). No obstante, en un estudio español multicéntrico del 2019, que no está incluido en este metaanálisis, y que analizó el endocuff en pacientes con SPS en fase de vigilancia, su uso no aumentó significativamente el número de lesiones serradas detectadas por paciente comparado con luz blanca y alta definición (5,8 vs. 5,0, respectivamente; $P=0,36$) (229). En conclusión, las recomendaciones sobre el uso de técnicas endoscópicas avanzadas en el diagnóstico y/o seguimiento de lesiones serradas se ven obstaculizadas por una falta de evidencia clara. También hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en centros expertos y que probablemente exista un sesgo de publicación a favor de resultados positivos. Además, su aceptación en la práctica clínica va a depender también de factores prácticos: su potencial para alargar o acortar el tiempo de exploración, el entrenamiento previo necesario por parte del endoscopista y, evidentemente, su coste adicional y su disponibilidad. Para el SPS faltan estudios sobre estos aspectos.

Biomarcadores Genéticos y Epigenéticos para el Riesgo de SPS y CCR

La observación de una cierta agregación familiar del SPS, así como un aumento de riesgo de CCR en los pacientes ha llevado a la búsqueda de variantes genéticas en línea germinal que pudieran conferir una predisposición para su desarrollo, y así identificar individuos que se beneficiaran de un cribado y/o vigilancia endoscópica más rigurosos. Sin embargo, a día de hoy no se han podido cumplir estos objetivos. Si bien es cierto que se han identificado variantes patogénicas en algunos individuos y familias, por ejemplo, de los genes *RNF43*, *MUTYH* y *PTEN*, estas solo se encuentran en un número muy reducido de afectos. Además, *MUTYH* y *PTEN* suelen presentar cuadros clínicos que se solapan con otros síndromes polipósicos debido a la presencia de un gran número de adenomas o hamartomas. Como consecuencia, su utilidad como biomarcador específico para el SPS es, como mínimo, cuestionable (230–233). Las variantes patogénicas en el gen *RNF43* – un regulador negativo de la vía de señalización WNT, son las que más se han asociado con la vía serrada. No obstante, un estudio reciente del 2021 no encontró ninguna variante patogénica constitucional en este gen. Asimismo, al analizar las mutaciones somáticas en lesiones serradas esporádicas y adenomas convencionales en pacientes con síndrome de Lynch, este estudio concluyó que su aparición no era ni un evento temprano en la carcinogénesis del CCR serrado ni específico para las lesiones serradas (234). Debido a la falta de evidencia, actualmente ninguna sociedad científica recomienda el uso de pruebas genéticas, con la excepción de la Sociedad Británica de Gastroenterología, la cual recomienda considerar el estudio genético mediante paneles en los afectos menores a cincuenta años, en familias con múltiples afectos y si se detecta displasia en alguna de las lesiones (166). El Colegio Americano de Gastroenterología en su guía más antigua del 2015 solo recomienda el análisis del gen *MUTYH* en los pacientes con SPS si presentan múltiples adenomas concomitantes (235). Los resultados de los estudios más recientes que usan paneles han sido más esperanzadores, aunque el número de los individuos analizados suele ser limitado y la interpretación de las variantes encontradas pueden causar dudas. En un estudio del 2022 en el que se usó un panel de quince genes en 73 de 173 pacientes con SPS se pudo identificar una variante patogénica en 7 de 73 individuos (9,6%): *MUTYH* (n=2), *SMAD4* (n=1), *CHEK2* (n=2), *POLD1* (n=1) y *RNF43* (n=1) (21). Sin embargo, hay que hacer hincapié en que la evidencia disponible sugiere que la agregación familiar probablemente sea poco frecuente, que la predisposición siga un patrón poligénico y que la base de la patogenia del SPS sean los cambios epigenéticos, particularmente en las fases iniciales. Esto también explicaría su mayor asociación con factores ambientales como el consumo del tabaco (236). Por eso, resulta muy atractivo buscar nuevos biomarcadores a nivel de la metilación del ADN. Otro punto a su favor es que se han detectado alteraciones epigenéticas en mucosa de aspecto macro y microscópicamente normal (96). La observación de que los pacientes con antecedentes de cáncer o pólipos colorrectales son más propensos a desarrollar lesiones metacrónicas que aquellos sin estas lesiones previas, ha llevado a la hipótesis de la cancerización del campo (o defecto del campo) (237,238). Según esta hipótesis, algunas alteraciones genéticas y epigenéticas surgen en el epitelio colónico de forma parcheada (en campos) y predisponen a la formación de pólipos y,

finalmente, cáncer. Esto es particularmente evidente para las lesiones serradas proximales donde la metilación aberrante del ADN de un panel de genes específico (panel 'CIMP') detectado en la mucosa normal se asoció con la presencia de lesiones serradas proximales avanzadas (239). Desde un punto de vista clínico, se ha propuesto que estas alteraciones en la mucosa normal podrían aprovecharse como una herramienta para identificar de forma muy precoz a los pacientes con alto riesgo de presentar o desarrollar lesiones (96). Sin embargo, las implicaciones clínicas de esta hipótesis aún no se han estudiado en profundidad. La vigilancia mediante colonoscopia intensiva en el SPS es costosa e incómodo para los pacientes. Además, estudios recientes sugieren que el riesgo de desarrollar cáncer bajo vigilancia es bajo y que los pacientes con menor riesgo podrían beneficiarse de la relajación de los intervalos (53). Para optimizar el manejo de estos pacientes, está claro que primero debemos comprender mejor los fundamentos moleculares de la vía serrada para luego disponer de biomarcadores moleculares para una mejor predicción del riesgo de cáncer. El segundo proyecto de esta tesis pretende contribuir a este objetivo.

1.4. El Microambiente Tumoral del Cáncer Colorrectal

1.4.1. El Rol del MAT para la Iniciación, Progresión y Metástasis

Los Rasgos Distintivos del Cancer

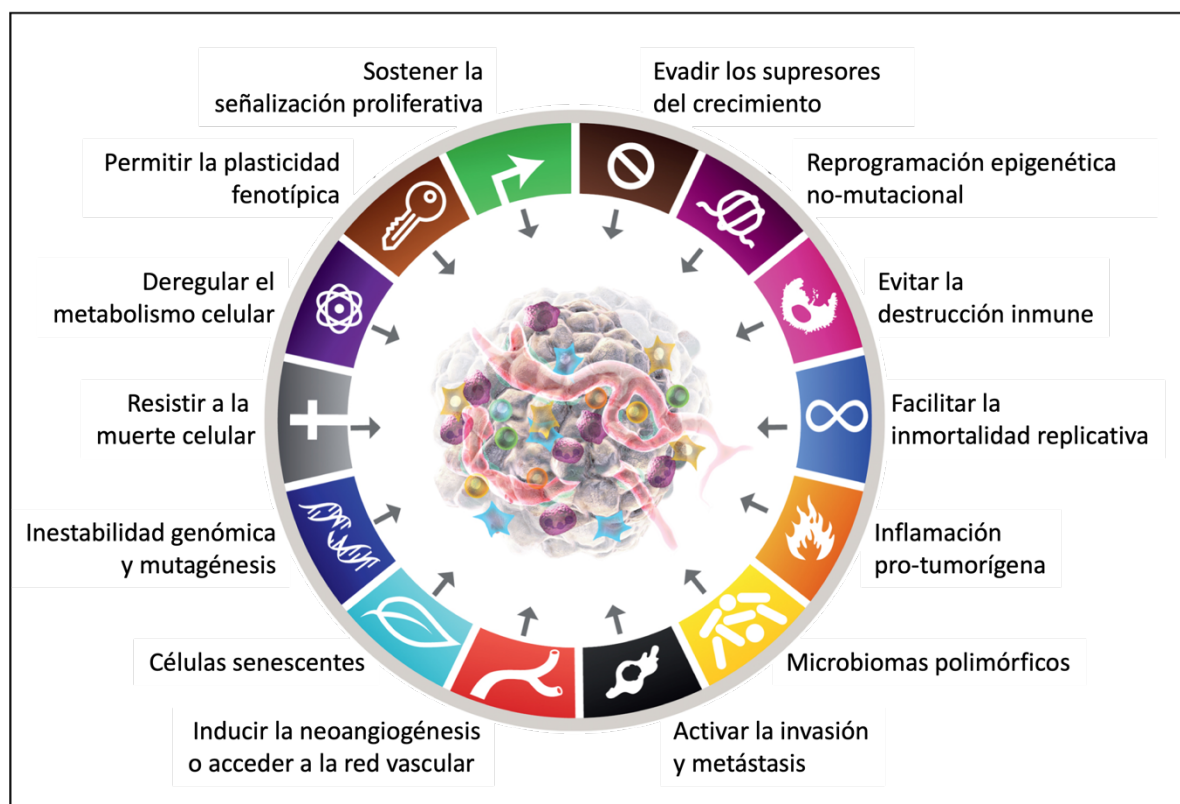


Figura 17 | Rasgos Distintivos del Cáncer

Gráfica extraída y traducida de: Hanahan D., Cancer Discov. 2022 Jan;12(1):31-46.
doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059

En 2011, con el fin de guiar la investigación y el desarrollo de nuevas terapias, Hanahan y Weinberg presentaron un modelo organizativo con el que intentaron gestionar la complejidad molecular y celular de cualquier tipo de cáncer a través de la definición de ocho rasgos distintivos, que en una actualización del 2022 fueron ampliados a catorce (fig. 17) (240,241). En los capítulos previos de la introducción se han explicado algunos de los mecanismos que subyacen a los cuatro primeros rasgos en el CCR: [1] la **proliferación sostenida** (activación de la vía MAPK), [2] la **evasión de las señales supresoras de crecimiento**, [3] la **resistencia a la muerte celular** (apoptosis, TP53), y, [4] la adquisición de una **inmortalidad replicativa**, es decir un estado *stem cell-like* (activación de la vía WNT). Cuando un tumor crece rápidamente, sus células pronto entrarán en una competición por oxígeno, nutrientes y señales de crecimiento lo cual causará la muerte de muchas de ellas. Como consecuencia, solo aquellas células que tengan una ventaja selectiva y estén altamente adaptadas a este entorno hostil y con capacidad de **reprogramar su metabolismo energético** – conocido como **efecto Warburg** y otro de los rasgos distintivos del cáncer [5], podrán sobrevivir (242). Si bien este mecanismo puede contrarrestar algunos de los efectos del estrés metabólico causado por la escasez de oxígeno y nutrientes, la muerte celular será inevitable en el centro del tumor, si éste sigue creciendo. Para garantizar su supervivencia, el tumor buscará cambiar su microambiente de tal manera que genere nuevos vasos sanguíneos con el fin de aumentar el aporte de nutrientes – un proceso llamado **angiogénesis** [6] (243). Bajo condiciones de hipoxia, el factor de transcripción HIF1A (o subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia) no es hidroxilado en sus restos prolínicos lo cual previene su degradación y permite su traslocación al núcleo donde activará la transcripción de unos sesenta genes. Uno de ellos es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual es secretado por las células cancerígenas a su entorno y facilita la migración y la proliferación de células endoteliales formando nuevos vasos sanguíneos. El VEGF media este efecto a través de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 y sus correspondientes vías de señalización (243). Otros dos rasgos distintivos de los cánceres según Hanahan y Weinberg son: [7] su capacidad de **invasión y metastatización**, y [8] la **capacidad de evadir la respuesta inmune** contra las células cancerígenas (240). Estos dos rasgos hacen aún más evidente que un cáncer avanzado no está compuesto solo por células cancerígenas, sino que para su progresión depende de otras células, de apariencia normal, pero que éste corrompe con el fin de su supervivencia.

La Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) y la Migración Celular Colectiva (MCC)

En condiciones sanas, la arquitectura normal de una cripta colónica está garantizada no solo a través de mecanismos de control de división celular y apoptosis, sino también por factores mecánicos. Entre estos destacan la adhesión intercelular (por ejemplo, mediante las cadherinas y claudinas), así como la adherencia de las células epiteliales con los componentes del estroma (por ejemplo, el colágeno). La pérdida de estos mecanismos contribuye a la distorsionada arquitectura de un cáncer. Así, en la secuencia adenoma-carcinoma del CCR se han observado cambios en la expresión de las moléculas de adhesión (244). Para que una célula tumoral logre la infiltración tisular, esta no solo tiene que haber perdido su polarización y la conexión con sus células vecinas, sino también haber ganado la capacidad de contraerse

y migrar. Este proceso se conoce como **transición epitelio-mesénquima** (TEM) en consonancia con la observación que las células tumorales en el frente de invasión presentan características fenotípicas y perfiles de expresión génica parecidos a las células mesenquimales semejantes a fibroblastos (245,246). Además, estas células secretan enzimas (por ejemplo, metaloproteinasas) que favorecen la degradación del colágeno extracelular y el remodelamiento de la matriz para así facilitar la migración de las células tumorales hacia los vasos sanguíneos y linfáticos – paso previo a su invasión vascular y linfática, y diseminación metastásica. Por otro lado, se ha visto que las células tumorales que presentan la capacidad de sembrar nuevos tumores tras su inoculación en ratones muestran características fenotípicas de las células madre de la cripta colónica normal (resumidas bajo el término inglés ‘*stemness*’). Debido a la expresión de varios marcadores conocidos para células madre intestinales (por ejemplo, el LGR5) se les ha denominado células madre cancerígenas (o *cancer stem cells*, CSC) (247,248). Tres de los rasgos que comparten las CSCs con las células madre normales son: uno, su capacidad de auto-renovarse; dos, su plasticidad fenotípica, es decir su capacidad de transformarse de forma bidireccional en formas más maduras (a través del proceso de diferenciación) o más *stem cell-like* (a través de des-diferenciación), y tres, su posibilidad de adoptar un estado quiescente en el que no se dividen, pero mantienen esta capacidad para el futuro. De hecho, este último rasgo podría explicar la resistencia de estas células a las terapias anti-proliferativas y la ocurrencia de metástasis a distancia tras una resección con intención curativa y años sin evidencia clínica de enfermedad tumoral (77,249). El hecho de que solo las células con rasgos de *stemness* son capaces de crecer metástasis es una de las razones por la que sigue habiendo controversia sobre el concepto de la TEM en el CCR (250). Por ejemplo, aún no está claro si las células tumorales solo realizan una TEM parcial manteniendo un cierto estado de *stemness* que les permitiría la proliferación una vez llegadas al sitio metastásico, o si allí experimentan la inversión de este proceso adoptando nuevamente características de células epiteliales (transición mesénquima-epitelio) (241). Además, para el CCR (entre otros cánceres) hay evidencia sobre una vía alternativa de invasión y metastatización: la **migración celular colectiva** (MCC). Esta se refiere al movimiento coordinado de grupos de células cancerosas que migran como una entidad colectiva en lugar de individualmente, manteniendo sus contactos intercelulares y una polarización antero-posterior dentro del grupo (251). De hecho, en un estudio reciente, publicado por Adrià Cañellas de nuestro grupo, las células residuales y ocultas responsables de la recaída metastásica tras resección curativa de un CCR primario no estaban ni diferenciadas ni *stem cell-like*, pero mostraron un incremento de la expresión de moléculas de adhesión intercelular y de migración (252).

Los Fibroblastos asociados al Cáncer (CAFs)

Fibroblastos son células que en condiciones sanas otorgan estructura y estabilidad a los tejidos. Bajo condiciones de daño tisular, por ejemplo, durante un proceso inflamatorio en una herida, estas se activan (ahora llamados miofibroblastos) y desarrollan la capacidad de contraerse, secretar componentes de la matriz extracelular, liberar moléculas señalizadoras que estimulan la formación de nuevos vasos (por ejemplo, el VEGF) y limitan la reacción

inflamatoria (por ejemplo, el TGF- β). El objetivo de estas medidas es reparar el daño tisular. La escasez de oxígeno y nutrientes en el centro de un tumor en rápida expansión causará la muerte de muchas células tumorales dejando un daño tisular notable e induciendo una fuerte reacción inflamatoria con el reclutamiento y la activación de diferentes células inmune al mismo tiempo que la activación de los fibroblastos (ahora llamados fibroblastos asociados al cáncer o 'CAFs', por sus siglas en inglés). Al contrario de lo que ocurre en una herida normal, los procesos de activación y terminación de la respuesta inmune y reparación tisular por fibroblastos y re-epitelialización no ocurren de forma coordinada en un cáncer por lo que no acaban siendo exitosas. Esta observación ha motivado a algunos autores a comparar el cáncer con una herida que nunca se cura (253). Adicionalmente, algunas células tumorales pueden secretar varias citoquinas para así generar un nicho (o estroma) que les protege de estímulos anti-proliferativos, de la destrucción por células inmunes y favorece su proliferación e invasión. Por ejemplo, se ha observado que el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), secretado por células tumorales, puede convertir los fibroblastos en CAFs. Asimismo, el TGF- β puede inducir la migración de células madre mesenquimales desde la médula ósea al sitio del cáncer en donde se diferencian en células semejantes a fibroblastos asociados al cáncer (o 'CAF-like', en inglés) (254). Los CAFs y los *CAF-like* dentro del estroma tumoral liberan citoquinas que promueven la supervivencia del tumor y facilitan su evasión inmune (255).

El Ciclo de Inmunidad contra el Cáncer

Hace ya más de 100 años que se formuló la hipótesis de la inmunovigilancia, según la cual una de las tareas esenciales del sistema inmune de organismos multicelulares complejos es detectar y eliminar células aberrantes previniendo la formación de neoplasias (P. Ehrlich, 1909) (256). Más tarde, el proceso aberrante por el que se desarrollan neoplasias a pesar de la inmunovigilancia se ha llegado a conocer como inmuoedición (o inmunocorrección) (257). Este proceso se divide en tres fases: durante la primera fase, las células tumorales iniciales son eliminadas de forma eficiente por las células inmunes, entre las que destacan las células asesinas naturales (o células NK), las células T cooperadoras CD4+ (o células Th), y las células T citotóxicas CD8+ (o células Tc). La segunda fase estaría marcada por un equilibrio entre células inmunes antitumorales y células neoplásicas emergentes. Debido a la creciente presión selectiva sobre las células tumorales, aquellas que logren escapar la destrucción inmune serán cada vez más prevalentes permitiendo eventualmente la formación de un tumor clínicamente detectable. El mecanismo repetitivo por el que el sistema inmune patrulla, reconoce y destruye células tumorales está resumido en el ciclo de inmunidad contra el cáncer (fig. 18). Este ciclo comienza con la captura y presentación de neoantígenos por parte de las células presentadoras de antígenos (células 'APC', por sus siglas en inglés) que luego migran a los ganglios linfáticos donde activan aquellas células T que tengan un receptor de la célula T compatible ('TCR'). A continuación, las células T activadas se dirigen al sitio del tumor donde reconocen y destruyen efectivamente las células cancerosas (258). Al analizar el microambiente de varios tumores se ha observado una enorme variabilidad del grado de infiltración por linfocitos intratumorales y se ha visto que esta se correlaciona con la carga

mutagénica del tumor y el pronóstico (259,260). Así, aquellos tumores con alto nivel mutagénico (por ejemplo, el melanoma o el cáncer de pulmón), generan también un mayor número de neoantígenos. Los neoantígenos se originan de ciertas mutaciones en el ADN de las células tumorales conduciendo a la expresión de péptidos o pequeñas proteínas estructuralmente distintas (y generalmente no funcionales) a las de las células sanas por lo que son capaces de provocar una fuerte reacción inmunogénica impulsada por las células T (261). Esta observación también se ha confirmado para el CCR, en el que se ha observado una mayor infiltración por linfocitos T en aquellos subtipos con alta carga mutacional debido a un defecto en el sistema de reparación del ADN – sea por mutación o bien por silenciamiento epigenético de los genes del sistema de reparación de emparejamientos erróneos (*Mismatch Repair*, en inglés; ‘MMR’) (262). En cuanto se haya eliminado el agresor, cada reacción inmune tiene que ser terminada de forma regulada para evitar la sobreestimulación y la autoinmunidad resultando en daño innecesario al tejido sano. Para este fin, el ciclo de inmunidad contra el cáncer dispone de dos principales puntos de control inmunitario: primero, en el momento de la activación por células APC, los linfocitos T activados empiezan también a expresar en su superficie las proteínas asociadas a los linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4, por sus siglas en inglés). Estas compiten con los receptores CD28 para los ligandos CD80/86 expresados en células APC. Mientras CD28 es un factor coactivador para las células T, CTLA-4 envía una señal inhibitoria a las células T superando al CD28, ya que se une con mayor afinidad y avidez a sus ligandos CD80/86. Esta señal acaba ralentizando el progreso del ciclo de la inmunidad (263,264). El segundo punto de control inmunitario importante se halla en el sitio del tumor donde aparecen diversos tipos de células con capacidad inmuno-inhibitoria a través de la expresión de los ligandos 1 o 2 de la muerte programada (PD-L1/2, por sus siglas en inglés). Estos se unen al receptor de muerte programada 1 (PD-1) expresado en la superficie de las células T. La activación de la vía de señalización del PD-1 causa la internalización del TCR – indispensable para el reconocimiento de los neoantígenos, frena su proliferación a través de la inhibición de la expresión de la interleucina-2 y finalmente induce la apoptosis (265). Entre las células que potencialmente expresan el PD-L1 se hallan los macrófagos, las células supresoras derivadas de los progenitores mieloides (‘MDSC’, por sus siglas en inglés) y las células T reguladoras (‘Treg’). Las Treg, en condiciones sanas, son un componente crucial de la tolerancia periférica en diferentes tejidos incluida la mucosa colónica y contribuyen a evitar la autoinmunidad.

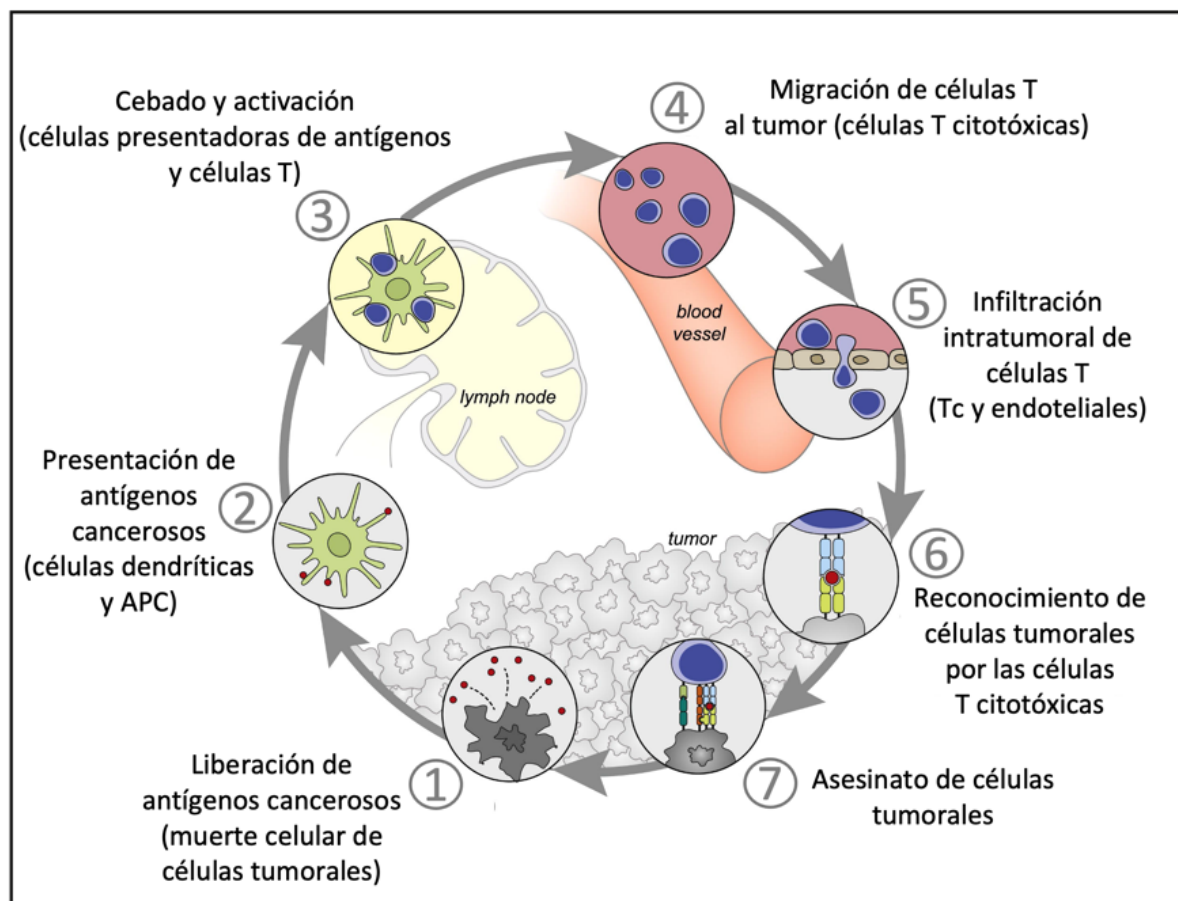


Figura 18 | El ciclo de inmunidad contra el cáncer

Para detalles: ver texto. Gráfica extraída y traducida de: Chen DS, Melman I. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):1-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012

El ciclo de la inmunidad contra el cáncer hace ver claramente qué mecanismos del microambiente pueden favorecer la entrada de un tumor original en la fase tres de la inmunoección, cuando están alterados. Primero, aquellas células tumorales que hayan perdido la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I ('MHC-I', por sus siglas en inglés) o que tengan un defecto en el procesamiento de los neoantígenos, no los presentarán en su superficie y como consecuencia serán invisibles para el TCR evadiendo así su destrucción y contribuyendo cada vez más a la masa tumoral (266). Segundo, la misma célula cancerígena puede sobre-expresar en su superficie el PD-L1 y así activar la vía del PD-1 en la célula T citotóxica transmitiéndole una señal inhibitoria y apoptótica, y evitando así su destrucción (267). Al mismo tiempo, el PD-L1 es capaz de reducir la apoptosis en las Tregs (268). Tercero, la célula tumoral u otras células del microambiente tumoral pueden secretar citoquinas y quimioquinas que favorecen un microambiente en el que predomina la actividad de las células inmuno-inhibitorias o reguladoras sobre la de las proinflamatorias y antitumorales (269). Esto el tumor lo puede lograr [1] a través de la activación de células reguladoras ya residentes en el microambiente como los Tregs que pueden inhibir directamente las células T o interactuar con células APC para inhibir la expresión de factores

coestimuladores; [2] a través del reclutamiento de células inmunosupresoras desde la médula ósea, por ejemplo los MDSCs mediante citoquinas como la IL-6 y la IL-10; o [3] a través del cambio de la polarización (es decir, del fenotipo) de ciertas células. Aquí cabe mencionar que mientras que algunos tipos de células tienen un efecto claramente antitumoral (por ejemplo, las células NK o las células Tc), muchos otros tipos de células del microambiente tumoral (inmunes y no inmunes) pueden tener un rol dual, es decir tener un efecto antitumoral o procancerígeno dependiendo del contexto concreto del microambiente en un momento determinado (270). Sin entrar demasiado en detalle, a continuación, se explicarán dos ejemplos importantes. Primero, como componentes esenciales de la inmunidad innata, los macrófagos en su polarización M1, presentan un potente efecto proinflamatorio, ayudan a la eliminación de las células tumorales y, en menor medida, participan en la activación de la inmunidad adquirida en su función como células presentadoras de antígenos. Sin embargo, cuando cambia el contexto, los macrófagos asociados al tumor ('TAMs', por sus siglas en inglés), ahora en su polarización M2, muestran una fuerte actividad inmunosupresora inhibiendo directamente las células T citotóxicas (por ejemplo, a través de la vía PD-L1 – PD-1) o indirectamente a través de la inhibición de la presentación de neoantígenos ligados al complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) en las APCs (por ejemplo, por IL-10) (271). Segundo, los fibroblastos son muy prevalentes en algunos subtipos de CCR. En una fase de activación inicial, generalmente proinflamatoria y antitumoral, la producción y depósito de fibras de colágeno puede incluso ayudar a limitar el crecimiento tumoral. Sin embargo, conforme aumenta su grado de activación, el creciente depósito de matriz extracelular y la contracción de la misma (lo cual le confiere la típica rigidez y dureza de un tumor avanzado) no solo excluye las células T del centro del tumor de forma mecánica, sino también favorece la liberación de citoquinas inmunosupresoras almacenadas en la matriz como el TGF- β (272). Los mecanismos celulares y moleculares del microambiente que favorecen la supervivencia y el crecimiento de un tumor no solo son necesarios en su sitio primario, sino también son cruciales en el sitio metastásico. Según la hipótesis de "la semilla y la tierra", una célula cancerígena (la semilla) solo lograría crecer una metástasis (la planta), si el tejido destino (la tierra) presenta un microambiente con las condiciones oportunas para su extravasación, nidación, crecimiento, y evasión de las señales apoptóticas y de la destrucción inmune (273,274). En el CCR, el lugar metastásico más frecuente es el hígado. Esto se explica no solo por su localización anatómica siendo el órgano diana de la circulación portal, sino también por su ambiente de inmunotolerancia periférica – necesaria por la exposición constante de este órgano a una multitud de antígenos inocuos de alimentos provenientes de los intestinos. Se han identificado diferentes mecanismos que subyacen esta inmunotolerancia hepática, como la inducción de Tregs o la eliminación de células T efectoras (274,275). En este sentido, se ha demostrado que pacientes con metástasis hepáticas presentan una menor diversidad y función de células T no solo intratumorales sino también sistémicas, lo cual lleva a una menor supervivencia en pacientes con metástasis hepáticas comparado con otros tipos de metástasis, independientemente de su carga mutacional. Estudios preclínicos sugieren que los macrófagos CD11b+ con actividad inmunosupresora podrían ser la fuente de la

eliminación de las células T a través de la vía del ligando FasL (276). Además, los datos sugieren que las metástasis hepáticas tienen la capacidad de reclutar macrófagos derivados de monocitos periféricos y polarizarlos de tal manera que contribuyen al ambiente inmunosupresor de la metástasis. Como consecuencia se ha visto que las respuestas a las inmunoterapias actuales que pretenden aumentar la respuesta antitumoral de las células T en pacientes con metástasis hepáticas son notoriamente muy reducidas (ver capítulo 5 de la introducción). Este ejemplo pone de manifiesto las sinergias que se generan entre los mecanismos normales de inmunotolerancia de un tejido sano y los mecanismos de inmunosupresión de los que se puede abusar un tumor a su favor. Por último, otra manera de ‘preparar’ el microambiente de un potencial sitio metastásico incluso antes de la llegada de la primera célula tumoral es a través de vesículas extracelulares. Estas son partículas con una membrana bicapa lipídica que son secretadas de las células tumorales, sirven de comunicación intercelular y pueden contener una gran variedad de moléculas como ácidos nucleicos incluyendo ARNm y microARN, citoquinas, quimioquinas, factores proangiogénicos y otros factores que regulan potencialmente una multitud de procesos celulares y transforman el microambiente tumoral (277). El hecho de que almacenan importante información del tumor y que son fácilmente detectables en sangre periférica, las hace muy atractivas como herramientas diagnósticas, por ejemplo, para predecir respuestas y resistencias a los tratamientos.

1.4.2. El MAT como Diana Terapéutica

Clásicamente, la célula cancerígena (epitelial) ha sido la principal diana de los tratamientos sistémicos para la eliminación completa de un tumor y prevenir su recaída (en fases precoces) o la reducción de la masa tumoral (en fase paliativa). Igual que la radioterapia, la mayoría de las quimioterapias clásicas (es decir, 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecán) actúan de forma semiselectiva sobre células proliferantes, lo cual no solo explica la mayoría de sus efectos adversos sino también la elevada tasa de recidivas debido a la resistencia de células tumorales quiescentes. Estas pueden reentrar en fase proliferativa, incluso tras años de latencia (278). Para superar estas limitaciones han emergido nuevos tratamientos dirigidos a las células tumorales, que bloquean vías de señalización específicas, por ejemplo el EGFR (cetuximab, panitumumab), HER2/neu (lapatinib, trastuzumab), RAF (encorafenib, dabrafenib, vemurafenib), MEK (selumetinib, trametinib, binimetinib) y WNT (napabucasin [BBI-608]) (279). Sin embargo, para el CCR, los éxitos con estos agentes han sido muy limitados hasta la fecha incluso cuando se utilizaban en combinación y en colectivos muy seleccionados, es decir con alteraciones en las correspondientes vías de señalización (por ejemplo, dabrafenib o vemurafenib solo en pacientes con la variante patogénica BRAFV600E). El rol del MAT en la progresión y la metastatización así como su impacto sobre el pronóstico han inspirado el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a sus mecanismos moleculares subyacentes y estas son motivo de nueva esperanza para el tratamiento del CCR (274,280).

Inhibición de la Angiogénesis

El aumento de la vascularización es una observación frecuente en muchos tumores incluido el CCR y hacía mucho tiempo que se postulaba como una potencial diana terapéutica (281). A día de hoy se han identificado cinco isoformas del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF-A – VEGF-E) y tres subtipos de receptores (VEGFR-1 – VEGFR-3) que regulan la angiogénesis y la linfangiogénesis. La isoforma que más se ha visto sobreexpresada en y secretada por células tumorales es el VEGF-A, el cual ejerce su función principalmente a través del VEGFR-2. Estas revelaciones permitieron el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos (282). Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra el VEGF-A, demostró disminuir la densidad de los vasos intratumorales y reducir el crecimiento tumoral *in vivo* (tras la inoculación de diferentes líneas celulares en ratones atímicos), pero no de las mismas líneas celulares *in vitro*, lo cual confirmó su acción sobre el MAT (283). A continuación, bevacizumab demostró su utilidad y seguridad en combinación con quimioterapia en varios ensayos clínicos de fase I a III, por lo que fue aprobado por las autoridades para el tratamiento del CCR en 2004 (FDA) y 2005 (EMA), y es considerado hoy en día un tratamiento de primera línea en el CCR metastásico (282). Un reciente metaanálisis del 2019 que incluyó siete ensayos aleatorizados confirmó la mejoría de la supervivencia global y de la supervivencia libre de progresión con la adición de bevacizumab a la quimioterapia frente a quimioterapia solo como primera línea en el CCR metastásico (284).

Inhibición de los Puntos de Control Inmunitario (*Immune Checkpoint Inhibitors*)

El descubrimiento de los puntos de control inmunitario propició la idea de que se podría potenciar la capacidad natural de nuestro sistema inmune para eliminar células cancerígenas, mediante el bloqueo de estos receptores (285). Esto parecía especialmente atractivo en aquellos tumores que mostraran una intensa infiltración por linfocitos inducida por la presencia de numerosos neoantígenos secundaria a una alta carga mutacional y que al mismo tiempo presentaran una sobreexpresión del PD-L1 (286). El tratamiento con anticuerpos monoclonales contra el PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) o el PD-L1 (atezolizumab, avelumab, durvalumab) supondría, en estos casos, una desinhibición de una respuesta inmune natural que había sido reprimida por el tumor a través de la sobreexpresión del PD-L1 (287–289). Ejemplos de tumores con alta carga mutacional y muy inmunogénicos son el melanoma, el carcinoma pulmonar de células grandes y el carcinoma de células renales, por lo que fueron estos los primeros en los que se demostró la efectividad y la seguridad de los inhibidores de los puntos de control inmunitario (IPCI) (287). En cambio, los primeros resultados con IPCIs en el CCR metastásico fueron decepcionantes (287,288). Sin embargo, cuando se incluyeron solo aquellos CCR metastásicos con inestabilidad de microsatélites (MSI-H) y/o sistema de reparación de emparejamientos erróneos deficiente (MMRd), los cuales son más mutagénicos e inmunogénicos, los resultados fueron más prometedores (290). Si bien se han sugerido la carga mutacional y la expresión de PD-L1 como predictores de la respuesta a los IPCIs, esto no se ha podido confirmar en todos los estudios y por lo tanto existe mucha controversia sobre su utilidad (290–293). Además, existe evidencia de estudios preclínicos que sugiere que la efectividad de los anticuerpos dirigidos contra la vía PD-1/PD-

L1 probablemente no se deba a la sobreexpresión de PD-L1 en las células tumorales sino en las células presentadoras de antígenos en el MAT (es decir, las células dendríticas y los macrófagos) (294). Otra cuestión no resuelta hoy en día es si el efecto de los anti-PD-1 y anti-PD-L1 es mediado por una reactivación de los linfocitos intratumorales ya presentes en el MAT o si este se debe a un reclutamiento de nuevos clones de células T específicos contra el cáncer (295–297). Otra diana de la inmunoterapia es el CTLA-4, el cual es expresado en las células T del ganglio linfático y previene la activación de estas cuando interactúa con los ligandos B7.1 y B7.2 de las células APC siendo ellas las presentadoras de los neoantígenos del tumor. El bloqueo del CTLA-4 mediante anticuerpos monoclonales (por ejemplo, tremelimumab e ipilimumab) permite la activación de las células T previo a su proliferación y su infiltración en el tumor potenciando así la respuesta inmune contra éste – una respuesta que en estudios preclínicos se mantuvo incluso tras una exposición secundaria sin nuevo tratamiento (264,289). En los primeros estudios clínicos, ipilimumab mostró una clara mejoría de la supervivencia en el melanoma metastásico pretratado (298). Sin embargo, similar a los anti-PD1/PD-L1, la monoterapia con anti-CTLA-4 (tremelimumab) en el CCR metastásico y refractario a quimioterapia no mostró un beneficio en un colectivo no seleccionado, pero sí resultó prometedor cuando se usaba (ipilimumab) en combinación con anti-PD-1 (nivolumab) en los CCRs metastásicos con MSI-H y/o MMRd (299,300). Por último, cabe mencionar que se han identificado diversas moléculas co-inhibitorias expresadas en las células T que son potenciales dianas terapéuticas (por ejemplo, LAG-3, TIM-3 y TIGIT). Asimismo, otra estrategia en investigación consiste en el desarrollo de agonistas de receptores coestimuladores de la respuesta T (por ejemplo, para el OX40, GITR y 4-1BB). Puesto que pocas de estas últimas terapias han superado los estudios de la fase I en el CCR y no son relevantes en esta tesis, no se explicarán en detalle y se refiere al lector a las correspondientes revisiones (289,301).

Inhibición del TGF- β

Estudios experimentales más recientes han logrado revelar algunos de los mecanismos de un estroma enriquecido por TGF- β que facilitan la evasión inmune y la formación de metástasis (302–304). En un estudio de Calon y colegas del 2012 se inyectaron células humanas de CCR de control (KM12L4a^{CON}) y células de CCR secretoras de TGF- β (KM12L4a^{TGF β}) en el ciego de ratones atímicos. Se observó que ambas dieron lugar a tumores agresivos, pero en el último caso las metástasis hepáticas y pulmonares fueron más frecuentes (305). Tras inyección intraesplénica se confirmó que el estroma activado por el TGF- β producido por estas células favorecía la formación de metástasis hepáticas las cuales presentaban una intensa reacción desmoplástica. En este modelo, todas las líneas celulares tenían la vía de señalización del TGF- β inactivada y se detectó la respuesta del TGF- β solo en el estroma y no en las células epiteliales (305). En el estudio de Tauriello y colegas del 2018, se inyectaron organoides tumorales (MTO, por sus siglas en inglés) con mutaciones en los genes *Apc*, *Kras*, *Tgfbr2* y *Tp53* en ratones singénicos con sistema inmune intacto. En este modelo, se observó que las metástasis hepáticas en fases iniciales estaban densamente infiltradas por linfocitos, pero

perdían esta infiltración conforme crecían, dejando los linfocitos al margen de las metástasis – un efecto llamado inmunoexclusión (303). Las metástasis presentaban las características de un CCR con microsatélites estables (MSS) junto con un fuerte incremento en la actividad del TGF- β en su estroma, siendo los fibroblastos los mayores contribuyentes a la producción de este. A continuación, el tratamiento de los ratones con galunisertib – un inhibidor del receptor del TGF- β 1 (TGFR1), once días después de la inyección de los MTO en el ciego, redujo el tamaño del tumor primario, redujo la extensión de la carcinomatosis y bloqueó la aparición de metástasis hepáticas. Asimismo, cuando inyectaban los MTO de forma intraesplénica para generar directamente metástasis hepáticas, la mayoría de los ratones permaneció libre de metástasis después de más de 300 días de seguimiento. Lo mismo ocurrió cuando se utilizó un modelo de ratón recombinante en el que se podía inactivar el receptor del TGF- β 2 (TGFR2) en fibroblastos, células endoteliales y leucocitos mediante la recombinación inducible por tamoxifeno. Estos resultados subrayan el rol del estroma en la medición de los efectos del TGF- β . Además, galunisertib solo anuló la capacidad metastásica en aquellos cánceres con mutación inactivante en la vía del TGF- β (*Smad4*) pero no en los individuos *wild-type*. A continuación, cuando se inactivaron las células CD8+ mediante un anticuerpo anti-CD8, se eliminó el efecto inhibitorio de galunisertib sobre la formación de metástasis, lo cual sugirió que el efecto terapéutico de galunisertib fue potenciar el efecto citotóxico de las células T. Bajo tratamiento con galunisertib, aumentó el reclutamiento de células CD3+ y CD4+, y se activaron las células T cooperadoras y citotóxicas. Por último, cuando se volvió a exponer a los ratones supervivientes al mismo tumor, los ratones rechazaron el tumor en dos semanas sin ningún tratamiento adicional, lo cual sugirió una inmunización contra el mismo. Sin embargo, este no fue el caso cuando se bloquearon los linfocitos CD8+ o en ratones *naive*. En resumen, la inhibición de TGF- β aumenta el número de células inmunitarias activadas. No obstante, aunque los ratones mostraron menos metástasis, resultó que solo unos pocos mostraron remisión completa. Al analizar en profundidad los puntos de control inmunitario, se observó una sobreexpresión de PD-1 y un reclutamiento de células estromales positivas para PD-L1 (principalmente macrófagos). El tratamiento de ratones con enfermedad metastásica con anti-PD-L1 en monoterapia solo tuvo un efecto terapéutico muy modesto sobre la supervivencia. Sin embargo, el tratamiento combinado con galunisertib y anticuerpos anti-PD-L1 indujo una respuesta inmunitaria pronunciada con un aumento de las células T CD4+ y CD8+, y los ratones mostraron una supervivencia prolongada durante más de un año después de la interrupción del tratamiento. Por lo tanto, en este estudio la inmunoterapia dual parece curar las metástasis establecidas en los CCR con MSS de alta capacidad de inmunoexclusión (303).

1.5. Nuevos Tratamientos del Cáncer Colorrectal

1.5.1. Introducción

Los pilares del tratamiento del CCR son la resección endoscópica o quirúrgica, la quimioterapia convencional, la radioterapia, las terapias sistémicas dirigidas y, de más reciente introducción, la inmunoterapia. La elección de un tratamiento o de una determinada combinación y secuencia de tratamientos dependerá de varios factores relacionados con las características del paciente, del tumor y del perfil de eficacia y seguridad de las diferentes opciones terapéuticas. En ciertas regiones del mundo, la disponibilidad o el coste de un determinado tratamiento pueden ser otros factores que influyan en la decisión terapéutica (306). Generalmente, los factores más importantes son la calidad de vida del paciente pre-tratamiento medida como el *performance status*, la localización del tumor, su estadio y, cada vez más, propiedades genéticas y moleculares del tumor. Así, la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO), en su guía del 2020 sobre CCR localizados, recomienda indicar un tratamiento adyuvante según el riesgo de recurrencia (alto), el beneficio esperado del tratamiento (alto) y el riesgo de toxicidad (bajo) (307). Mientras que la resección endoscópica de un tumor pT1 sin factores de riesgo o la resección quirúrgica de un pT1 con factores de riesgo o de un estadio II sin factores de riesgo pueden ser suficientes y curativos, la terapia será cada vez más compleja y las tasas de curación y/o respuesta cada vez menores, cuanto más avanzado sea el tumor: ver guías de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (308); de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) (309); y de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) (306). Desde los años 50 del siglo pasado y durante muchas décadas, el único tratamiento sistémico disponible para el CCR era el 5-fluorouracilo (5-FU) – un antimetabolito que interfiere con la síntesis del ADN, y, en menor medida, del ARN causando la apoptosis de células con rápida división celular (310). Este mecanismo explica no solo su efecto deseado sobre el crecimiento tumoral, sino también sus efectos adversos debidos a la destrucción de células sanas que también presentan una alta tasa de división celular, por ejemplo, la mucosa intestinal (vómitos y diarrea), el folículo capilar (efluvio anágeno), las células hematopoyéticas (anemia, leucopenia), etcétera. A partir de los años 90 del siglo pasado, dos nuevas sustancias fueron introducidas: un alquilante que causa la formación de puentes cruzados entre las bases del ADN (oxaliplatino, aprobado por la FDA en 2002) y un inhibidor de la topoisomerasa I (irinotecán, aprobado por la FDA en 1996). De forma similar al 5-FU, estos compuestos interfieren con la síntesis del ADN por lo que también actúan de forma semiselectiva sobre células en rápido crecimiento y tienen efectos adversos similares. La combinación de estos con el 5-FU (abreviado FOLFOX y FOLFIRI, respectivamente) mejoraron significativamente las tasas de respuesta, por lo que hoy en día todas las guías de práctica clínica europeas y americanas las consideran como primera línea de tratamiento sistémico de los estadios avanzados ($\geq$ III) y de algunos casos de estadio II con factores de riesgo: SEOM (308), ESMO (309) y ASCO (306). Sin embargo, es evidente que su efecto sigue siendo limitado y causan importantes efectos adversos. Así, en un reciente metaanálisis del 2017, la mediana de supervivencia libre de progresión con doble terapia

(FOLFOX o FOLFIRI) en el CCR metastásico fue de nueve meses y la de supervivencia global veintiún meses. El mismo metaanálisis encontró que la combinación de los tres fármacos (FOLFOXIRI) mejoraba los resultados significativamente. No obstante, ni este triple tratamiento conseguía medianas de supervivencia global superiores a los 30 meses (311). Una de las posibles razones por las que el efecto de estos fármacos es limitado radica en el hecho de que no eliminan subpoblaciones de células tumorales que se encuentren en estado quiescente – definido por una baja proliferación y unas características semejantes a células mesenquimales y/o células madre capaces de reentrar en fase proliferativa incluso tras años de latencia y dar lugar a una recurrencia (278). Otro estudio similar, más reciente, ha encontrado que la célula de origen de la recurrencia podría ser una determinada célula madre cancerígena dentro del tumor, que bajo quimioterapia reduce su programa WNT y entra en un estado latente con un perfil de expresión génica que se asemeja a un progenitor intestinal fetal facilitando así la regeneración del tumor (312).

Una verdadera revolución en los años 2000 fue el desarrollo de las terapias dirigidas. Se denominan así porque están dirigidas específicamente a las células epiteliales neoplásicas y bloquean receptores o moléculas de sus vías de señalización que se encuentren alteradas. Esto la hacen con mayor independencia del estado de replicación del ADN, por lo que aumentan la eficacia y presentan menos efectos adversos (313). Finalmente, con las revelaciones sobre el microambiente tumoral (ver capítulo cuatro de la introducción), la inmunoterapia es la protagonista más reciente a entrar en el escenario del tratamiento del CCR durante la segunda década de los años 2000 (290). No está al alcance de esta tesis describir todas las modalidades de tratamiento del CCR. Como se ha visto antes, el CCR metastásico sigue presentando una supervivencia miserable por lo que la siguiente sección se centrará en éste. Después de un breve resumen de lo que han conseguido las nuevas terapias dirigidas al microambiente tumoral incluida la inmunoterapia, se discutirá la creciente necesidad de disponer de nuevos métodos para predecir la respuesta teniendo en cuenta que las terapias del futuro serán cada vez más personalizadas.

1.5.2. Tratamientos dirigidos al Microambiente Tumoral

Inhibidores de la Angiogénesis

Las revelaciones sobre la importancia del microambiente tumoral para la supervivencia y diseminación del tumor han llevado al desarrollo de terapias que ya no tienen la célula neoplásica epitelial como diana sino las demás células y componentes que también forman la masa tumoral. Esto ha supuesto un verdadero cambio de paradigma en el tratamiento sistémico del CCR. El primer tratamiento aprobado (en 2004) que se dirige al MAT en lugar de a la célula cancerígena, fue el bevacizumab – un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A). Desde entonces, la evidencia sobre su efectividad ha hecho que todas las guías de práctica clínica (GPC) lo hayan incluido en sus recomendaciones como posible adyuvante en el tratamiento de primera línea en la mayoría

de los diferentes escenarios moleculares del CCR metastásico. Así, su indicación actualmente se contempla en: 1) los CCR que presentan variantes patogénicas en los genes *RAS* o *BRAF* por lo que no son candidatos para tratamiento con anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab o panitumumab); 2) los CCR en los que se desconoce el estado mutacional del *RAS*; 3) los CCR *RAS wild-type* con localización en colon izquierdo; y 4) como alternativa al anti-EGFR en los CCR *RAS wild-type* con localización derecha (ver las guías de la SEOM (308), ESMO (309), ASCO (306) y NCCN (314)). Un reciente metaanálisis que incluyó once estudios aleatorizados y controlados con más de tres mil pacientes demostró que la tasa de respuesta objetiva en pacientes con CCR avanzado fue casi tres veces superior para la combinación de bevacizumab con FOLFOX comparado con FOLFOX solo, mientras que la tasa de efectos adversos solo fue un 30% más alta (315). Otro metaanálisis reciente de estudios observacionales sugirió que la adición de bevacizumab a la quimioterapia en el escenario neoadyuvante en pacientes con metástasis hepáticas potencialmente resecables, mejoraba las respuestas patológicas y podría incrementar la supervivencia (316). Por último, un metaanálisis de Japón del 2021 sugirió que la combinación de 5-FU con bevacizumab como tratamiento de mantenimiento tras quimioterapia de inducción aumentaba significativamente la supervivencia global y libre de progresión comparado con no mantenimiento y con cada tratamiento en monoterapia (317). A pesar de todo el entusiasmo, los efectos observados en todos los estudios en cuanto a supervivencia global siempre han sido como mucho moderados y la resistencia también es un reto con los anti-VEGF. Dos posibles mecanismos que podrían explicarla son la sobreexpresión y secreción de la angiopoyetina por parte del tumor con la consiguiente activación de una vía alternativa de angiogénesis, y la sobreexpresión del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) (313). Para superar la resistencia en el primer caso, se ha desarrollado un fármaco que bloquea al mismo tiempo el receptor-2 del VEGF y la angiopoyetina-1 – el regorafenib, el cual ya está incluido en las GPC si bien solo como tercera línea de tratamiento y en pacientes muy seleccionados. Es probable que se extienda su indicación en el futuro puesto que ya existe un metaanálisis que demuestra su utilidad como adyuvante a la quimioterapia en el tratamiento de segunda línea, particularmente en los CCR con variantes patogénicas en *BRAF* o *KRAS* (318). El aflibercept (bloquea el VEGF-A y VEGF-B) y el ramucirumab (bloquea el VEGFR2) son otros dos fármacos que se están ensayando en estudios de fase III.

Llama la atención que la mayoría de los tratamientos dirigidos contra dianas moleculares sólo se emplean en fases avanzadas del CCR cuando el paciente ya presenta metástasis a distancia. Además, los ensayos clínicos suelen examinar los fármacos nuevos en contexto de cánceres refractarios a múltiples líneas de tratamiento previo. Es evidente que cuanto más avanzado se encuentra un tumor, más difícil es de tratar debido a su creciente heterogeneidad genética, epigenética y celular intratumoral que resultan de la presión selectiva por la inmunidad antitumoral del paciente y las terapias antineoplásicas, y desemboca en una (casi) inevitable resistencia farmacológica. De ahí se explican las bajas tasas de respuesta generalmente observadas con los fármacos nuevos. En cambio, el uso de estas terapias (cetuximab,

panitumumab, bevacizumab) como primera línea y/o en fases menos avanzadas podría mostrar potencialmente mejores resultados. No obstante, la evidencia actual de ensayos clínicos de fase III sugiere que la adición de anti-EGFR o anti-VEGF a la quimioterapia adyuvante del CCR resecado en estadio III o estadio II de alto riesgo no confiere mejores resultados que la quimioterapia sola (319–321).

Inmunoterapia – Inhibidores del Punto de Control Inmunitario (IPCI)

Los IPCI son los fármacos más recientes que se han incorporado al armamento para tratar el CCR metastásico. Los primeros estudios de fase II con pembrolizumab (Keytruda®) – un anti-PD1, en pacientes que habían progresado tras dos o más líneas de tratamientos previos demostraron una tasa de respuesta objetiva de entre el 28% y 52%, y una tasa de supervivencia libre de progresión al año de hasta el 78% (322–324). Las respuestas con nivolumab (Opdivo®) – otro anti-PD1, en el estudio de Overman y colegas en 2017 fueron algo inferiores, pero aumentaron cuando se combinó con ipilimumab (Yervoy®) – un anti-CTLA-4, lo cual obtuvo una tasa de respuesta objetiva del 49%, respuesta completa del 4%, y una tasa de supervivencia libre de progresión al año del 71% (300,325). Sin embargo, estos resultados solo se observaron para los CCR con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) y/o sistema de reparación del ADN deficiente (MMRd), mientras que la respuesta para los tumores con microsatélites estables (MSS) o MMR competente (MMRp) era prácticamente nula en estos primeros estudios. En vista de estos resultados la FDA aceleró el proceso de aprobación de estos fármacos para el tratamiento del CCR metastásico, MSI-H/MMRd y pretratado. Como consecuencia, la GPC más reciente (ASCO, 2020) los ha incluido como tratamiento de segunda o tercera línea si no se habían usado como segunda (306). La GPC más reciente de la SEOM (2019) afirmó que los IPCI son una opción en el caso de CCR metastásico, MSI-H/MMRd y resistente al tratamiento convencional, incluso cuando aún no estaban aprobados por la EMA, hecho que ya ha cambiado³ (308). Otro estudio sugirió que el pembrolizumab podría ser más efectivo cuando los pacientes habían recibido menos líneas de tratamiento previo. Así, aunque la tasa de respuesta objetiva fue igual entre los que habían recibido una línea previa comparado con dos o más, la tasa de respuesta completa fue superior (8% vs. 3%, respectivamente) y también la tasa de supervivencia libre de progresión al año era mayor (41% vs. 34%, respectivamente) (326). Es más, un estudio de fase III que comparó el pembrolizumab como primera línea con la quimioterapia convencional (mFOLFOX6 o FOLFIRI) demostró que pembrolizumab fue superior en cuanto a tasa de respuesta objetiva (44% vs. 33%), tasa de supervivencia libre de progresión al año (55% vs. 37%) y supervivencia global (mediana no alcanzada para pembrolizumab vs. 36,7 meses para la quimioterapia convencional), y eso incluso con menos efectos adversos (327). Estos resultados propiciaron que la FDA aprobara el pembrolizumab como primera línea de tratamiento en los CCR MSI-H/MMRd en el año 2020 (328). Para la combinación de nivolumab e ipilimumab como primera

³ Para Keytruda®: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda>

Para Opdivo®: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/opdivo>

Para Yervoy®: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yervoy>

línea de tratamiento, un estudio de fase II de Lenz y colegas publicado en 2022 mostró tasas de respuesta objetiva (69%) y tasas de respuesta completa (13%) superiores a las previamente publicadas por el mismo grupo cuando se utilizó tras dos o más líneas de tratamiento previas (49% y 4%, respectivamente) (300,329). Si bien este estudio carecía de brazo de control con quimioterapia como tratamiento estándar, este estudio supone evidencia preliminar de que no sólo el pembrolizumab, sino también la combinación de nivolumab e ipilimumab, podría ser efectiva para el tratamiento de primera línea en los CCR metastásicos MSI-H/MMRd. La observación de que la inmunoterapia en el melanoma daba mejores resultados en estadios precoces, motivó a Chalabi y colegas a diseñar un estudio en el cual administraron nivolumab e ipilimumab como tratamiento neoadyuvante en pacientes con CCR de fases I, II y III. El razonamiento detrás del estudio fue que los estadios más precoces podrían responder mejor debido a una menor carga tumoral y un menor grado de inmunosupresión sistémica. Asimismo, en su estudio también incluyeron tumores tipo MSS/MMRp con la idea de que algunos de ellos podrían presentar aún cierta infiltración por linfocitos T debido a un menor grado de inmunoexclusión. Notablemente, este estudio no solo demostró una respuesta objetiva del 100% de los MSI-H/MMRd (con un 27% de respuesta completa y desaparición del tumor), sino también un 27% de respuesta objetiva de los MSS/MMRp (con un 13% de respuesta completa) – un subtipo de CCR que hasta la fecha se pensaba que tenía una resistencia intrínseca a los IPCI (330). Actualmente, varios estudios están en marcha que intentan superar esta resistencia mediante diversas estrategias (290). La idea fundamental radica en usar técnicas (la radioterapia, por ejemplo) y/o fármacos que incrementan la carga mutacional del tumor y al mismo tiempo inducen la apoptosis o necrosis tumoral para así facilitar la liberación de neoantígenos previo al tratamiento con IPCI conduciendo a una mayor activación y proliferación linfocítica. Así, en un estudio de fase II reciente, se trataron 135 pacientes con CCR metastásico con temozolomida, un alquilante del ADN que induce hipermutación. El 88% de estos pacientes habían recibido como mínimo dos líneas previas de tratamiento y todos los tumores eran MSS/MMRp y presentaban silenciamiento del gen *MGMT* – un biomarcador validado para predecir la respuesta a la temozolomida. Los 33 pacientes que no murieron ni progresaron bajo tratamiento con temozolomida, luego recibieron inmunoterapia con nivolumab e ipilimumab y se observó una tasa de respuesta objetiva del 45% y una tasa de supervivencia libre de progresión al año del 25%. Los datos de estos últimos estudios suponen una prueba de concepto que algunos CCR MSS/MMRp tanto en fases precoces como en fases metastásicas podrían ser tributarias de inmunoterapia, si bien aún no está claro cuáles son las estrategias más oportunas.

Terapias Dirigidas al Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β)

El TGF- β no había sido un candidato ideal para desarrollar tratamientos dirigidos a bloquear su señalización, debido a su rol dual en la carcinogénesis, ya que presenta actividad anti- y pro-tumoral. Sin embargo, aumenta la evidencia señalando que en fases avanzadas claramente favorece la metastatización (331). Varios estudios preclínicos con modelos murinos sugieren que la inhibición del TGF- β previene la invasión y la metastatización del CCR

(303,332–334). Es más, el estudio de Tauriello y colegas del 2018 demostró que la combinación de IPCI con un inhibidor del TGF- β podría curar las metástasis hepáticas en un modelo con CCR MSS/MMRp (303). Durante la última década se han desarrollado varios tratamientos capaces de inhibir la señalización mediada por el TGF- β siendo las moléculas pequeñas (por ejemplo, galunisertib [LY2157299], vactosertib [TEW-7197] y LY2109761) y los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, fresolimumab) los más atractivos (331,335). Inicialmente hubo dudas sobre la seguridad de los inhibidores del TGF- β y algún ensayo tuvo que suspenderse precozmente debido a efectos cardiotóxicos (la señalización del TGF- β está implicada en la ontogénesis del corazón y los grandes vasos). No obstante, el desarrollo de una nueva generación de inhibidores como el galunisertib y la optimización de las pautas de administración, mejoraron el perfil de seguridad y disiparon estas dudas (336). Así, la gran mayoría de los ensayos de fase I demostró una buena tolerabilidad. A día de hoy existen muy escasos ensayos clínicos sobre su uso en el CCR metastásico, pero resultados en otros cánceres (sobre todo pancreático, hepatocelular, glioblastoma y de células renales) han sido prometedores. Por ejemplo, en un ensayo aleatorizado (2:1) y controlado con placebo de fase Ib/II, la adición de galunisertib a gemcitabina en el tratamiento de 156 cánceres pancreáticos metastásicos resultó en una mejoría de la supervivencia global (15,5 meses vs. 9,9 meses; $P=0,10$) (337). En su estudio, Melisi y colegas identificaron varios biomarcadores candidatos, incluidos algunos microARNs, que predecían la respuesta al tratamiento. Otro ensayo, no controlado, con galunisertib como segunda línea de tratamiento (tras sorafenib) de carcinoma hepatocelular mostró una mejoría de la supervivencia en aquellos pacientes que presentaban una alfa-fetoproteína y expresión de TGF- β inicialmente bajas pero con reducción de más del 20% bajo tratamiento (338). Para el CCR metastásico, hasta la fecha solo hay datos anecdóticos de ensayos clínicos, pero existe un ensayo de fase I en marcha que está explorando la combinación de vactosertib y pembrolizumab en CCR metastásico (NCT03724851), otro ensayo de fase I con la combinación de LY3200882 y capecitabina en CCR avanzado resistente y con estroma activado por TGF- β (NCT04031872), y, por último, un ensayo de fase II con combinación de galunisertib, radioquimioterapia (5-FU + capecitabina) y posterior resección en cáncer rectal avanzado (estadio II-IV) (NCT02688712). Además, hay varios estudios en marcha con otros inhibidores del TGF- β en tumores sólidos avanzados. La experiencia preliminar de los estudios previamente citados sugiere que solo un subgrupo de pacientes se beneficiará del tratamiento con inhibidores del TGF- β , previsiblemente aquellos con un estroma enriquecido por TGF- β solapando con el subtipo molecular de consenso 4 (CMS4). Sin embargo, esta hipótesis todavía no se ha demostrado. Es evidente que una adecuada selección de pacientes solo será exitosa si el diseño de futuras terapias va acompañado del desarrollo de biomarcadores u otras herramientas predictivas.

1.5.3. Predicción de la Respuesta Terapéutica

Como hemos visto, las opciones terapéuticas con fármacos sistémicos contra el CCR están creciendo rápidamente. No solo siguen surgiendo nuevos agentes, sino que también, la

combinación oportuna de varios de ellos o con otras modalidades de tratamiento (la radioterapia, por ejemplo), potencialmente puede incrementar el éxito terapéutico. Las nuevas terapias derivan de la comprensión más profunda de las alteraciones moleculares en las células tumorales y su microambiente mediante el estudio 'ómico' exhaustivo, es decir genómico, epigenómico, transcriptómico, proteómico, metabolómico, y en un futuro probablemente también, microbiómico. La tecnología a día de hoy es tan avanzada que es capaz de secuenciar el ADN y el ARN a nivel de células individuales. La multitud de opciones terapéuticas por un lado y la singularidad de combinación de alteraciones moleculares en un tumor por otro, generan una creciente necesidad de disponer de herramientas para predecir a cuál de las diversas opciones responderá un paciente concreto. Así pues, estamos viviendo la transición hacia una medicina personalizada o 'de precisión' en la cual se elegirá un tratamiento no sólo a base de sus características anatomopatológicas (como la localización, el estadiaje y el grado histológico) sino también de sus características moleculares, y esta lista se está ampliando continuamente. Así, la SEOM en su GPC del 2019 recomienda el tratamiento con anti-EGFR solo en casos sin evidencia de variantes patogénicas en los genes *BRAF* y *KRAS*. Asimismo, la SEOM contempla que la sobreexpresión o la amplificación del gen *HER2/neu* puede ser un biomarcador para el tratamiento con trastuzumab + lapatinib, y el estado de MSI-H/MMRd para el tratamiento con IPCIs (308). La utilidad de las variantes patogénicas en el gen *RAS* como predictor negativo de respuesta al tratamiento con anti-EGFR está bien documentada con un metaanálisis que demuestra que los pacientes con tumores *RAS wild-type* se benefician de la adición del cetuximab o panitumumab en términos de respuesta objetiva, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (339). Sin embargo, visto desde otro ángulo, el estado *wild-type* del gen *RAS* no es un buen predictor de respuesta a los anti-EGFR, ya que las tasas de respuesta objetiva entre los estudios citados en este metaanálisis varían entre el 16% y 66%, comparado con el 0% al 46% sin añadir anti-EGFR. En otras palabras, entre un 44% y 84% no responderán a la adición del anti-EGFR, aunque tengan un estado *wild-type*. También hay que recalcar que con las técnicas de secuenciación masiva se siguen descubriendo nuevas variantes en los genes *RAS* y no siempre está clara su contribución a la resistencia terapéutica (340). Este ejemplo ilustra que las decisiones terapéuticas son cada vez más complejas y requieren la intervención de equipos multidisciplinares que incluyen no solo a oncólogos, radioterapeutas y cirujanos, sino también a anatomopatólogos, genetistas, y tal vez a biólogos moleculares.

En el caso de los IPCIs, los ensayos clínicos demostraron una respuesta solo en aquellos CCR metastásicos que eran MMRd o MSI-H (290). Esto está en línea con la lógica de que un tumor con MMRd producirá más neoantígenos capaces de inducir una potente reacción inmunológica reflejada en una densa infiltración por linfocitos. Al mismo tiempo, estos linfocitos quedarían inhibidos por el tumor a través de la expresión de los receptores PD-1 y/o PD-L1 y la consiguiente activación de las vías de los puntos de control inmunitario. Los IPCIs actuarían a través de una *des*-inhibición de la reacción inmunológica en un tumor inherentemente inmunogénico. Siguiendo este razonamiento, se ha propuesto la falta de

expresión de una o más de las proteínas del sistema MMR mediante inmunohistoquímica (MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2) como un biomarcador para la respuesta al tratamiento con IPCIs, incluso independiente del tipo de tumor primario (323). Como alternativa, se puede analizar el estado mutacional de determinados microsatélites, cuya inestabilidad es un marcador subrogado y bien validado del MMR deficiente. Similar a lo que hemos comentado con los anti-EGFR y el estado mutacional de los genes *RAS*, el estado de MMRp o MSS son muy buenos predictores negativos, pero el estado MMRd y/o MSI-H no garantiza un beneficio con los IPCIs en los CCR metastásicos, ya que solo se observó una respuesta en alrededor del 40% de los casos (ver apartado anterior). Además, como hemos visto, tampoco parece ser un predictor ideal en el escenario de tratamiento neoadyuvante de estadios no metastásicos, ya que un pequeño grupo de pacientes puede responder aun teniendo un tumor MMRp/MSS (330). Para optimizar la selección de pacientes, se han propuesto otros potenciales predictores como la carga mutacional del tumor, la infiltración intratumoral por linfocitos T y la expresión de PD-1 y/o PD-L1 como biomarcadores candidatos (341). Por ejemplo, Le y sus colegas trataron solo a aquellos pacientes con IPCIs cuyo cáncer tenía un sistema MMR deficiente y al mismo tiempo mostraban un alto número de mutaciones somáticas. No obstante, igualmente solo algo más del 50% mostraron algún tipo de respuesta objetiva (323). Aunque la expresión del PD-L1 se ha asociado con un peor pronóstico en un metaanálisis reciente, su valor como predictor terapéutico es muy controvertido y faltan estudios con números de participantes adecuados (342,343). Así pues, aunque los biomarcadores mencionados han mejorado la selección de pacientes para tratamiento con IPCIs, es evidente que su capacidad predictiva sigue siendo muy limitada por lo que se están buscando nuevas tecnologías para predecir la respuesta.

En entornos preclínicos, los sistemas de cultivo clásicos de líneas celulares tumorales han sido muy útiles para estudiar, con alto rendimiento, los efectos antiproliferativos de la quimioterapia sobre las células tumorales (344). Sin embargo, los tumores evolucionan a partir de muchos subclones con diferentes alteraciones genéticas y perfiles de expresión que conducen a una gran heterogeneidad en su capacidad para crecer, invadir, hacer metástasis y responder a los tratamientos (345). Como un desarrollo adicional de los cultivos celulares clásicos, hoy en día se pueden generar *in vitro* pequeños fragmentos de tumor llamados organoides a partir de biopsias tumorales derivadas del paciente ('PDO', por sus siglas en inglés). Los PDO recapitulan de manera tridimensional parte de la heterogeneidad intratumoral del paciente (346). No obstante, una desventaja de los PDO de primera generación sigue siendo que derivan solo de las células epiteliales del tumor y carecen de todas las partes del microambiente tumoral, incluidos los fibroblastos, los macrófagos, los linfocitos T infiltrantes y otras muchas células del sistema inmunitario, por lo que no son útiles para evaluar los tratamientos dirigidos a estos componentes (346).

Otra alternativa usada en entornos preclínicos son los xenoinjertos derivados de pacientes. Esta técnica intenta aislar células tumorales del paciente e implantarlas en ratones con el fin de recapitular su crecimiento dentro de un estroma más natural. Esta técnica permite un

mejor estudio de la heterogeneidad intratumoral y de las interacciones celulares bajo el efecto de diferentes terapias. Los últimos avances tecnológicos han hecho posible el trasplante ortotópico de células humanas de CCR en el colon murino e incluso la generación de metástasis hepáticas a través de la inyección intraesplénica o intraportal de células tumorales. No obstante, la gran limitación de esta técnica radica en la necesidad de usar ratones atímicos, es decir sin sistema inmune adaptativo para así evitar el rechazo de las células malignas humanas. Por lo tanto, no sirve tampoco para evaluar la respuesta a terapias que van dirigidas a estos componentes. Aunque se están desarrollando modelos de ratones humanizados, es decir con sistema inmune humano intacto, otra limitación de los xenoinjertos es que es una técnica laboriosa y que no permite probar muchos tratamientos en paralelo sin provocar un gasto financiero y de animales elevados – un aspecto bioético que está preocupando a una creciente parte de nuestra sociedad (347).

Más recientemente, se han descrito dos técnicas que intentan cultivar muestras tumorales en una interfaz aire-líquido ('ALI', por sus siglas en inglés), sin paso previo de disgregación. La idea es mantener el microambiente intacto y facilitar su supervivencia y crecimiento a través de la difusión de nutrientes y factores de crecimiento desde la fase líquida (abajo) y el oxígeno desde la fase aérea (arriba) (fig. 19). Brevemente, la primera técnica corta una muestra tumoral en fragmentos muy pequeños de unos 500 – 1.000 μm (llamados *air liquid interface organoids* en inglés, abreviado '**ALIO**'). Luego, se resuspenden los fragmentos tumorales en una matriz extracelular sin paso previo de disgregación enzimática manteniendo así el estroma intacto, y se coloca esta suspensión en un inserto con membrana permeable generando la interfaz aire-líquido (fig. 19a) (348). La segunda técnica utiliza una vibrátomo para realizar cortes gruesos (de unos 250 μm) de una muestra tumoral previa inclusión en un molde de agarosa, igualmente con la idea de mantener intacto el estroma. Los cortes se transfieren a una membrana permeable que está flotante en el medio de cultivo (ahora llamados cultivos organotípicos, abreviado '**COT**') generando así la interfaz aire-líquido similar a los ALIOs (fig. 19b) (349). Teóricamente, ambas técnicas permiten explorar el efecto de diferentes tratamientos – estén dirigidos a las células tumorales o a su microambiente, sobre su viabilidad bajo evaluación histopatológica e inmunofenotípica directas. Así, Neal y colegas en 2018 pudieron demostrar que los ALIOs derivados de diferentes tumores humanos son capaces de recapitular *in vitro* la respuesta al tratamiento con anti-PD-1 (nivolumab) consistente en una expansión y activación de linfocitos intratumorales. Además, confirmaron un efecto citotóxico dependiente del nivolumab (348). Este estudio demostró la viabilidad de modelar los efectos de tratamientos dirigidos al microambiente tumoral *in vitro*. Si se optimizan los protocolos, los ALIOs y los COTs podrían albergar un gran potencial como herramienta de la medicina personalizada mejorando la selección de terapias a base del comportamiento biológico *in vitro* de una muestra de tumor concreto, similar a los antibiogramas utilizados en enfermedades infecciosas. No obstante, esto aún no se ha demostrado para el tratamiento con IPCIs de metástasis de CCR. Por eso, el tercer proyecto

de esta tesis intentará probar esta hipótesis mediante un modelo murino de metástasis hepáticas de CCR.

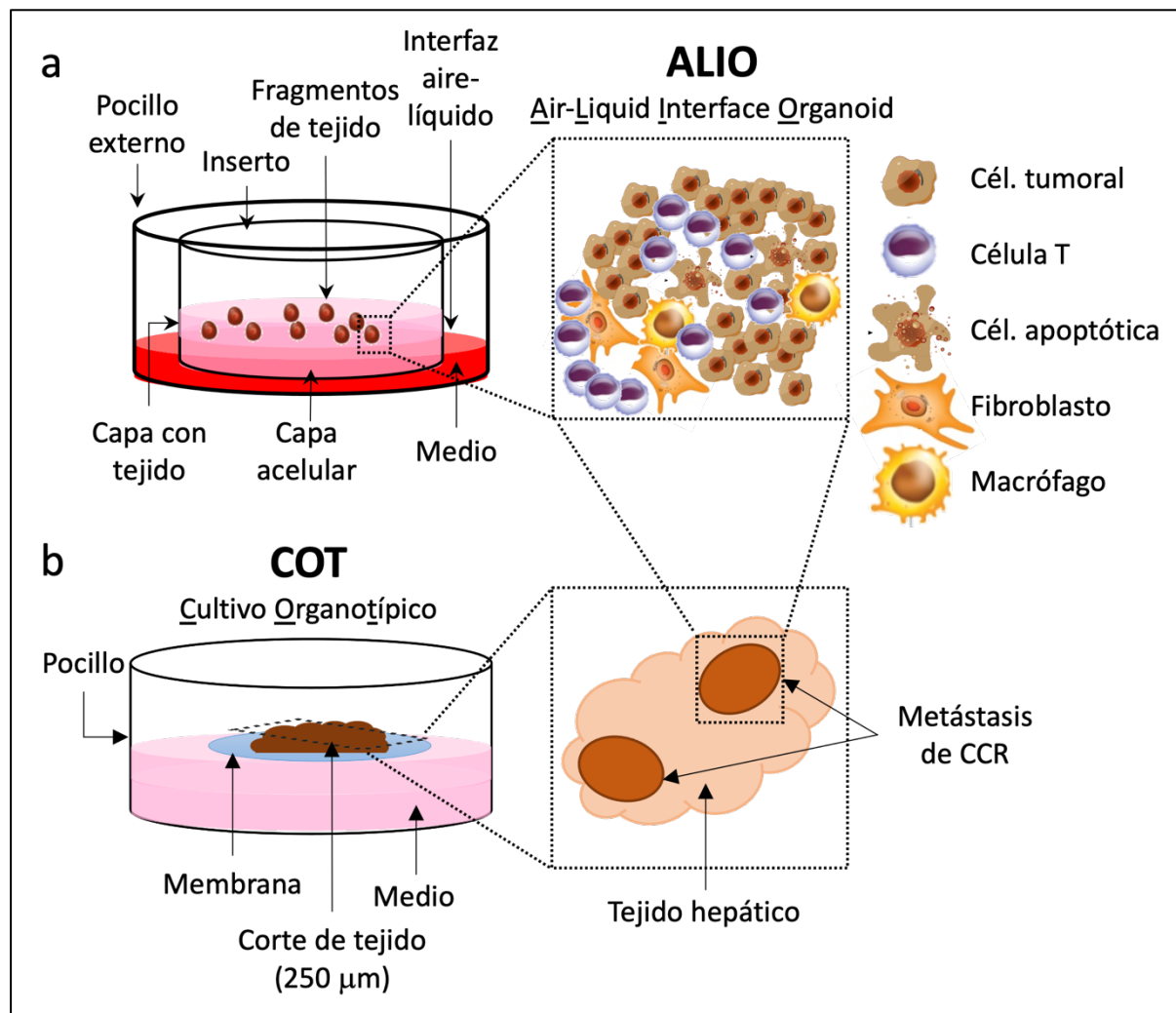


Figura 19 | Esquema de un cultivo de organoides con interfaz aire-líquido (ALIO) (arriba) y de un cultivo organotípico (COT) (abajo).

Para detalles: ver texto. Gráfica: elaboración propia.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS & OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS & OBJETIVOS

2.1. Justificación General de la Tesis

El Cáncer Colorrectal (CCR) supone el paradigma de una enfermedad tributaria de medidas preventivas, ya que es una patología muy prevalente en nuestra sociedad, se conocen bien sus factores de riesgo e historia natural, y existen pruebas y tratamientos eficaces para su detección y eliminación en fase premaligna o muy precoz mejorando así su incidencia y morbimortalidad.

Mientras que el cribado de la población de riesgo medio y la vigilancia de las formas de alto riesgo han mejorado notablemente la incidencia y el pronóstico, la prevención del CCR asociado a la Colitis Ulcerosa (CCR-CU) y al Síndrome de Poliposis Serrada (SPS) es subóptima. En ambos casos se basa en realizar colonoscopias periódicas, un proceso costoso para los sistemas de salud e incómodo para los pacientes. Además, la detección de las lesiones precursoras suele ser difícil por sus características morfológicas. Otra particularidad de ambas condiciones es la presencia de un defecto de campo, presente en mucosa de aspecto normal, que predispone a la formación de múltiples lesiones a lo largo del colon con potencial de malignización. Se ha demostrado que las alteraciones moleculares subyacentes al defecto de campo podrían servir de biomarcadores precoces.

La epigenética estudia los procesos que regulan la expresión génica y engloban la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y la expresión de ARN no codificantes. Estos procesos no solo ayudan a entender mejor la fisiopatología del CCR más allá de las variantes génicas, sino también han demostrado su utilidad como fuente de potenciales biomarcadores. En particular, la hipermetilación del ADN en regiones promotoras es un hallazgo frecuente de la vía serrada. Por otro lado, los microARNs están implicados en varias vías de señalización del CCR esporádico y de procesos inflamatorios, y existe evidencia preliminar sobre su rol en el CCR asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal. Por lo tanto, es oportuno explorar si se pueden aprovechar las alteraciones de la metilación del ADN y la expresión de microARNs para mejorar el diagnóstico del CCR asociado al SPS y a la Colitis Ulcerosa (CU), respectivamente.

Por otro lado, casi la mitad de los pacientes diagnosticados con CCR morirá a causa de una recurrencia o por enfermedad metastásica a pesar de los tratamientos adyuvantes que se utilizan en la actualidad. La experiencia clínica ha demostrado que las respuestas a los tratamientos antineoplásicos son altamente individuales, incluso dentro de una entidad específica de cáncer, como el cáncer de colon. Además, la heterogeneidad intratumoral, la cual es cada vez mayor conforme va avanzando el estadio, dificulta la posibilidad de curar a los pacientes completamente de cada una de las células cancerosas con las estrategias terapéuticas actuales. Por esta razón, se reivindican enfoques terapéuticos personalizados que combinan diferentes tratamientos y se dirigen a vías moleculares alteradas específicas a

nivel individual. A medida que ha avanzado nuestra comprensión molecular de la biología tumoral, en los últimos años se ha identificado una multitud de dianas susceptibles del desarrollo de medicamentos específicos, lo cual ha facilitado el desarrollo de una plétora de nuevos fármacos prometedores. A pesar de todo el entusiasmo, una implementación rápida a la práctica clínica se ve obstaculizada por el hecho de que es muy difícil producir evidencia científica de eficacia a escala clínica, ya que solo se beneficiará un pequeño subconjunto de pacientes. Por lo tanto, necesitamos herramientas de diagnóstico que permitan predecir la respuesta al tratamiento a nivel individual.

La medicina personalizada aplicada al CCR pretende ajustar las medidas preventivas, diagnósticas y terapéuticas al perfil de riesgo individual de cada paciente, pero las herramientas en uso clínico actual para conseguirlo aún son escasas.

2.2. Las Hipótesis de la Tesis

Hipótesis 1:

El CCR-CU y el CCR esporádico tienen un perfil de expresión de microARNs diferente y algunos microARNs son potenciales biomarcadores específicos y precoces para la progresión neoplásica en la colitis ulcerosa.

Hipótesis 2:

El defecto de campo por hipermetilación del ADN constituye un mecanismo de carcinogénesis en el SPS y podría ser un biomarcador para la detección del SPS y de un mayor riesgo de CCR en los pacientes afectados.

Hipótesis 3:

Los organoides tumorales de segunda generación, cultivados en condiciones de interfaz aire-líquido (ALIO) y los cultivos organotípicos (COT) capturan la mayor parte de la heterogeneidad intratumoral, recapitulan la interacción entre el tumor y el microambiente tumoral (MAT) y pueden explotarse para estudiar *in vitro* la respuesta a tratamientos dirigidos contra componentes clave del MAT, como el TGF- β y PD-L1, que han demostrado ser esenciales para la diseminación metastásica.

2.3. Los Objetivos Generales y Específicos de la Tesis

Objetivo General 1:

El primer objetivo general de la tesis es identificar y validar biomarcadores tipo microARN en tejido para diferenciar las lesiones con displasia asociadas a la CU de larga evolución de los

adenomas esporádicos con el fin de detectar aquellos pacientes con riesgo de progresión neoplásica en la CU.

Objetivo General 2:

El segundo objetivo general es describir el fenómeno de hipermetilación del ADN en mucosa normal de pacientes con SPS, identificar potenciales biomarcadores para esta entidad y analizar su asociación con el desarrollo de CCR.

Objetivo General 3:

El tercer objetivo general es desarrollar y evaluar, mediante la investigación básica, una metodología que permita la predicción de la respuesta a terapias dirigidas al microambiente tumoral usando un modelo murino.

Objetivos Específicos de la Tesis

1. Analizar el perfil de expresión de microARNs preseleccionados mediante tarjetas microfluídicas en muestras parafinadas de pacientes con CU de larga evolución con displasia y/o CCR en zonas silentes, pero previamente afectadas por CU (cohorte de estudio). Analizar el patrón de expresión a lo largo de la secuencia mucosa normal – displasia – carcinoma.
2. Analizar el perfil de expresión de microARNs en muestras parafinadas de mucosa normal, adenomas y CCR esporádicos provenientes de la población de cribado de riesgo medio (cohorte de control). Analizar el patrón de expresión a lo largo de la secuencia esporádica: mucosa normal – adenoma – carcinoma.
3. Comparar los perfiles de expresión de las dos cohortes (estudio y control) con el fin de identificar aquellos microARNs que presentan una desregulación progresiva y consistente a lo largo de las dos secuencias (CU *versus* esporádica), y que al mismo tiempo son específicos para la CU y detectan la displasia asociada a la CU con alta fiabilidad.
4. Mediante PCR cuantitativa en tiempo real, validar aquellos microARNs con mayor capacidad para detectar la displasia en una cohorte independiente y prospectiva de las dos secuencias.
5. Analizar el perfil de metilación del ADN en la mucosa normal de pacientes con SPS y su asociación con el desarrollo de CCR.
6. Comparar el perfil de metilación del ADN en mucosa normal en diferentes segmentos del colon en pacientes con SPS, y su asociación con el desarrollo de CCR.
7. Analizar la relación de la metilación del ADN con factores como el consumo de tabaco y la obesidad en pacientes con SPS, y su asociación con el desarrollo de CCR.
8. Validar los resultados obtenidos en una población independiente de pacientes con SPS.

9. Analizar el perfil de metilación del ADN en lesiones serradas y comparar con aquel detectado en mucosa normal.
10. En un modelo murino de CCR, definir los puntos temporales en los que el sistema inmunitario se excluye o se pierde completamente en el MAT *in vivo* y en qué momento el MAT se enriquece en TGF- β .
11. Generar cultivos con interfaz aire-líquido de explantes de metástasis hepáticas generadas a partir de la inyección de organoides tumorales derivados de ratones (ALIO) y optimizar el protocolo para asegurar la mejor viabilidad de las células cancerosas y todos los componentes del MAT.
12. Comparar la composición de los ALIOs, incluidas las células cancerosas y los componentes del MAT, con el tejido metastásico inicial y analizar su evolución a lo largo del tiempo en condiciones de cultivo con interfaz aire-líquido.
13. Evaluar la respuesta al tratamiento *in vivo* de los ratones con anti-TGF- β solo (galunisertib), anti-PD-L1 solo (nivolumab) o anti-TGF- β y anti-PD-L1 combinados (galunisertib + nivolumab) mediante bioluminiscencia *in vivo* tras inyección de organoides tumorales en ratones.
14. Evaluar la respuesta al tratamiento *in vitro* de los ALIO con anti-TGF- β solo (galunisertib), anti-PD-L1 solo (nivolumab) o anti-TGF- β y anti-PD-L1 combinados (galunisertib + nivolumab).
15. Comparar la respuesta *in vitro* con aquella *in vivo*.
16. Analizar la expresión de genes relacionados con la activación de células T, con el cambio de fenotipo de macrófagos y fibroblastos en respuesta a los diferentes tratamientos.
17. Generar cultivos organotípicos a partir de cortes de metástasis hepáticas y evaluación de la viabilidad de las células tumorales.
18. Evaluar la respuesta al tratamiento *in vitro* de los COTs con anti-TGF- β solo (galunisertib), anti-PD-L1 solo (nivolumab) o anti-TGF- β y anti-PD-L1 combinados (galunisertib + nivolumab).
19. Comparar los resultados con los experimentos *in vivo* y con los ALIO.

MATERIAL, MÉTODOS & RESULTADOS

3. MATERIAL, MÉTODOS & RESULTADOS

3.1. Resultados del Primer Proyecto

MicroARNs como nuevos biomarcadores para la progresión neoplásica en la colitis ulcerosa

Differentially deregulated microRNAs as novel biomarkers for neoplastic progression in ulcerative colitis

Artículo Original

Isabel Quintanilla, PhD^{*1,3,5}, **Gerhard Jung, PhD^{*1,2,3,4}**, Mireya Jimeno, PhD^{1,6}, Juan José Lozano, PhD^{3,7}, Julia Sidorova, PhD^{3,7}, Jordi Camps, PhD^{1,3}, Sabela Carballal, PhD^{1,2,3,4}, Luis Bujanda, PhD^{3,8}, Maria Isabel Vera, PhD⁹, Enrique Quintero, PhD¹⁰, Marta Carrillo-Palau, PhD¹⁰, Miriam Cuatrecasas, PhD^{1,3,11}, Antoni Castells, PhD^{1,2,3,4}, Julià Panés, PhD^{1,2,3,4}, Elena Ricart, PhD^{1,2,3,4}, Leticia Moreira, PhD^{1,2,3,4}, **Francesc Balaguer, PhD^{1,2,3,4}**, **Maria Pellisé, PhD^{#1,2,3,4}**

Clin Transl Gastroenterol. 2022 Jul 1;13(7):e00489. doi: 10.14309/ctg.0000000000000489. Epub 2022 Apr 8. PMID: 35404333.

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

² Department of Gastroenterology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Spain

⁴ Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵ National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD 20892, USA

⁶ Department of Pathology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

⁷ Bioinformatics Platform, CIBEREHD, Barcelona, Spain

⁸ Department of Gastroenterology, Biodonostia Health Research Institute, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), San Sebastián, Spain

⁹ Department of Gastroenterology, University Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, Spain

¹⁰ Department of Gastroenterology, University Hospital of the Canary Islands, Santa Cruz de Tenerife, Spain

¹¹ Department of Pathology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

*Ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo. #Autora correspondiente.

Resumen (traducción):

INTRODUCCIÓN:

El cáncer colorrectal (CCR) es una complicación potencialmente mortal de la colitis ulcerosa (CU) de larga evolución. Los microARN son reguladores epigenéticos implicados en el desarrollo del CCR asociado a la CU (CCR-CU). Sin embargo, su papel como potenciales biomarcadores en mucosa para la progresión neoplásica no se ha estudiado adecuadamente.

MÉTODOS:

En este estudio, analizamos la expresión de 96 microARNs preseleccionados en tejido humano fijado en formalina e incluido en parafina de 52 biopsias de casos (20 de mucosa normal, 20 de displasia y 12 de CCR-CU) y 50 biopsias de controles (10 de mucosa normal, 21 de adenomas esporádicos y 19 de CCR esporádicos) utilizando tarjetas microfluídicas personalizables tipo *Custom TaqMan Array Cards*. Para la validación de los microARNs desregulados, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa individual en tiempo real en una cohorte independiente de 50 casos (13 de mucosa normal, 25 de displasia y 12 de CCR-CU) y 46 controles (7 de mucosa normal, 19 de adenomas esporádicos, y 20 de CCR esporádicos).

RESULTADOS:

Encontramos que sesenta y cuatro microARNs estaban desregulados diferencialmente a lo largo de la secuencia del CCR-CU. Se eligieron ocho de estos microARNs para la fase de validación. Confirmamos que miR-31, -106a y -135b estaban significativamente desregulados entre la mucosa normal y la displasia, así como a lo largo de la secuencia de CCR-CU (todos $P < 0,01$). Se confirmó que estos microARNs también tenían una expresión diferencial significativa en comparación con el CCR esporádico (todos $P < 0,05$).

DISCUSIÓN:

Los CCR esporádicos y asociados a la CU tienen patrones de expresión de microARNs distintos y algunos microARNs indican una progresión neoplásica temprana.

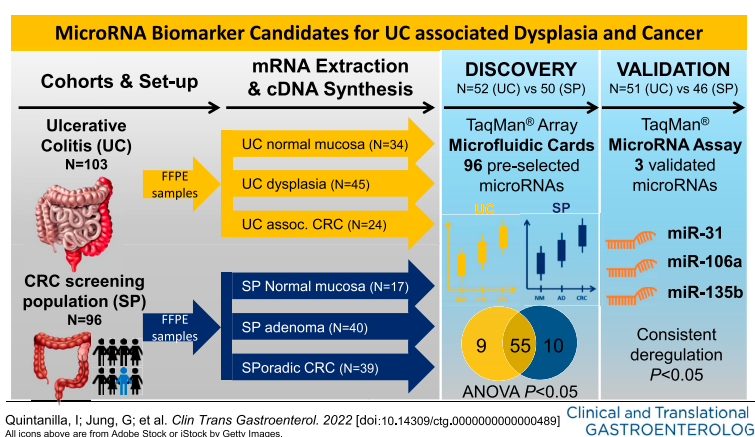
PDF del artículo: ver siguiente página.

Differentially Deregulated MicroRNAs as Novel Biomarkers for Neoplastic Progression in Ulcerative Colitis

Isabel Quintanilla, PhD^{1,2,3,*}, Gerhard Jung, PhD^{1,2,4,5,*}, Mireya Jimeno, PhD^{1,6}, Juan José Lozano, PhD^{2,7}, Julia Sidorova, PhD^{2,7}, Jordi Camps, PhD^{1,2}, Sabela Carballal, PhD^{1,2,4,5}, Luis Bujanda, PhD^{2,8}, Maria Isabel Vera, PhD⁹, Enrique Quintero, PhD¹⁰, Marta Carrillo-Palau, PhD¹⁰, Miriam Cuatrecasas, PhD^{1,2,11}, Antoni Castells, PhD^{1,2,4,5}, Julià Panés, PhD^{1,2,4,5}, Elena Ricart, PhD^{1,2,4,5}, Leticia Moreira, PhD^{1,2,4,5}, Francesc Balaguer, PhD^{1,2,4,5} and Maria Pellisé, PhD^{1,2,4,5}

INTRODUCTION: Colorectal cancer (CRC) is a potentially life-threatening complication of long-standing ulcerative colitis (UC). MicroRNAs (miRNA) are epigenetic regulators that have been involved in the development of UC-associated CRC. However, their role as potential mucosal biomarkers of neoplastic progression has not been adequately studied.

METHODS: In this study, we analyzed the expression of 96 preselected miRNAs in human formalin-fixed and paraffin-embedded tissue of 52 case biopsies (20 normal mucosa, 20 dysplasia, and 12 UC-associated CRCs) and 50 control biopsies (10 normal mucosa, 21 sporadic adenomas, and 19 sporadic CRCs) by using Custom TaqMan Array Cards. For validation of deregulated miRNAs, we performed individual quantitative real-time polymerase chain reaction in an independent cohort of 50 cases (13 normal mucosa, 25 dysplasia, and 12 UC-associated CRCs) and 46 controls (7 normal mucosa, 19 sporadic adenomas, and 20 sporadic CRCs).



¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain; ³National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Maryland, USA; ⁴Department of Gastroenterology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ⁵Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁶Department of Pathology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁷Bioinformatics Platform, CIBERehd, Barcelona, Spain; ⁸Department of Gastroenterology, Biodonostia Health Research Institute, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), San Sebastián, Spain; ⁹Department of Gastroenterology, University Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, Spain; ¹⁰Department of Gastroenterology, University Hospital of the Canary Islands, Santa Cruz de Tenerife, Spain; ¹¹Department of Pathology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain.

Correspondence: Maria Pellisé, PhD. E-mail: MPELLISE@clinic.cat

*Isabel Quintanilla and Gerhard Jung contributed equally to this work.

Received November 18, 2021; accepted March 4, 2022; published online April 8, 2022

© 2022 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of The American College of Gastroenterology

RESULTS: Sixty-four miRNAs were found to be differentially deregulated in the UC-associated CRC sequence. Eight of these miRNAs were chosen for further validation. We confirmed miR-31, -106a, and -135b to be significantly deregulated between normal mucosa and dysplasia, as well as across the UC-associated CRC sequence (all $P < 0.01$). Notably, these miRNAs also confirmed to have a significant differential expression compared with sporadic CRC (all $P < 0.05$).

DISCUSSION: UC-associated and sporadic CRCs have distinct miRNA expression patterns, and some miRNAs indicate early neoplastic progression.

SUPPLEMENTARY MATERIAL accompanies this paper at <http://links.lww.com/CTG/A803>, <http://links.lww.com/CTG/A804>, <http://links.lww.com/CTG/A805>, <http://links.lww.com/CTG/A806>, and <http://links.lww.com/CTG/A807>.

Clinical and Translational Gastroenterology 2022;13:e00489. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000489>

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) has been associated to a higher risk of developing colorectal cancer (CRC) (1,2), and a recent large population-based cohort study concluded that the risk of diagnosis of CRC in patients with IBD has not declined significantly in the past 35 years (3).

Current surveillance strategies aim to identify dysplasia, which is considered a premalignant lesion and thus associated with a high risk to develop CRC. Although there is only evidence from case series and cohort studies, most of the societies recommend 1- to 5-yearly colonoscopy for surveillance starting from 8 to 10 years of disease onset, unless specific risk factors for dysplasia, such as primary sclerosing cholangitis, are also present (4,5).

However, there are several shortcomings when it comes to detect and diagnose dysplasia accurately. First, their low detection rates during surveillance colonoscopy (6,7). In fact, interval cancers are significantly more frequent in IBD-associated cases compared with sporadic cases and are most likely due to not detected or not completely resected dysplastic lesions (8). Second, the poor interobserver agreement among both endoscopists and pathologists to distinguish dysplastic from inflammation-associated morphologic alterations. Third, this poor interobserver agreement is also applicable when differentiating low-grade dysplasia from high-grade dysplasia (9). And fourth, the difficulty in reliably distinguishing colitis-associated dysplasia from sporadic adenomas by histopathologists (10,11).

The difficulties to accurately detect and diagnose dysplasia as the premalignant lesion of colitis-associated cancer have led to the search for more robust, objective, and minimally or noninvasive biomarkers (12). MicroRNAs (miRNAs) are ideal candidates for biomarkers because of their small size, stability in biological samples, availability in blood samples (circulating miRNAs), ability to regulate hundreds of mRNAs, and their relatively small total number compared with mRNAs. Moreover, miRNAs have been linked to pathogenic processes such as inflammation signaling, endothelial-mesenchymal transition, cancer stem cells, and metastatization (13–15).

In UC-associated CRC (UC-CRC), the evidence about the role of miRNAs in inflammation and carcinogenesis is less abundant compared with sporadic CRC (Sp-CRC), but several studies have found promising preliminary results (16–18). Although most of the previous studies had focused on disease-specific expression patterns in both ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease, some recent studies aimed to identify differentially expressed miRNAs in UC-CRC (19–22). However, there is only a handful of studies

that analyzed single miRNAs associated to UC-CRC, but their sample sizes were rather low, they were not validated with independent cohorts, dysplasia was not considered, or specificity for UC-associated CRC over sporadic CRC was not addressed.

Despite the burgeoning knowledge of miRNAs as regulators in both maintained inflammation and inflammation-associated carcinogenesis, these processes are not fully understood, and more research is needed to find biomarkers for clinical use. Our study aimed to find miRNAs that are differentially and specifically expressed in the colorectal carcinogenesis associated with UC and could serve as biomarkers to improve the detection of UC-associated dysplasia (UC-Dys).

MATERIAL AND METHODS

Patients and sample cohorts

The study group included 103 tissue specimens from 94 patients with UC who were referred for dysplasia screening or diagnosed with a CRC arising on a colitic area and fulfilling all the following eligibility criteria: (i) endoscopically and pathologically confirmed UC proximal to the rectum, (ii) disease duration of at least 8 years, and (iii) absence of clinical activity (i.e., noninvasive 6-point partial Mayo Score (23) < 3), to avoid bias introduced by inflammatory processes. To be considered as a UC-associated lesion, dysplasias and CRCs had to be arisen in areas previously affected by chronic inflammation. The control group included 96 tissue specimens from 96 different individuals from the FIT-based organized Barcelona-Eixample-Esqueria population CRC Screening Program, in which all individuals aged 50–69 years are invited to participate, and a FIT cutoff of ≥ 20 μg of hemoglobin/g of feces is used to indicate a colonoscopy. Personal history of CRC, adenoma, or inflammatory bowel disease, a family history of CRC (defined as those individuals with 2 first-degree relatives with CRC or 1 diagnosed before the age of 60), known hereditary CRC syndromes, severe coexisting illness, colonoscopy performed within the past 5 years, previous colectomy, and contraindication for colonoscopy are considered definitive or temporary exclusion criteria for screening.

The samples from the study group and the control group were each divided to form 2 independent cohorts: (i) a discovery cohort with 52 samples from the study group (20 UC normal mucosa biopsies [UC-NM], 20 UC-associated dysplastic lesions [UC-Dys], and 12 UC-associated colorectal cancers [UC-CRC]) and 50 samples from the control group (10 normal mucosa biopsies [Sp-NM], 21 sporadic adenomas [Sp-Ad], and 19 sporadic CRC [Sp-CRC]) (Figure 1). All samples derived from different unique patients except for 3 patients of the study group who provided 1 sample of normal mucosa and 1 sample of dysplasia and 2

patients who provided 2 samples of dysplasia. (ii) The validation cohort was composed of 51 samples from the study group: 14 UC-NM, 25 UC-Dys, and 12 UC-CRC and 46 samples from the control group: 7 Sp-NM, 19 Sp-Ad, and 20 Sp-CRC (Figure 1). All samples derived from different patients except for 4 patients who provided 2 samples of dysplasia. Sporadic adenomas in patients with UC were disregarded in this study.

Tissue samples of normal mucosa, UC-associated dysplasia, and sporadic adenoma were obtained by colonoscopy, whereas CRC specimens derived from surgical blocks. All samples were fixed by immersion in buffered formalin immediately after the colonoscopy or surgery and then processed and embedded in paraffin (FFPE). All specimens were evaluated by pathologists at each participating institution, according to the Vienna classification and the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer tumor, node, metastasis grading system. Before RNA extraction, microdissection of relevant tissue was performed by using a biopsy punch device.

RNA extraction from FFPE specimens

RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (ref. AM1975, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used to extract total RNA from tissue cores, according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined with a NanoDrop 1000 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE).

Quantitative reverse-transcription PCR assays

For the discovery phase, 96 miRNAs were selected after a comprehensive literature and database research based on their previously described functions in cell cycle control, signal transduction, cell-cell interaction, inflammation, and tumorigenesis, as well as their potential biomarker role in colorectal cancer or colitis-associated cancer. We used 96-well Custom TaqMan Array Microfluidic Cards (ref. 4342261; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for the evaluation of miRNA expression levels in patient samples. All RNA samples were first reverse-transcribed to cDNA by using the TaqMan MicroRNA Reverse-Transcription Kit (ref. 4366596; Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 100 ng of RNA was reverse-transcribed in a final volume of 15 μ L per reaction under the following conditions: 30 minutes at 16°C, 30 minutes at 42°C, and 5 minutes at 85°C. Then, the cDNA was preamplified for 14 cycles using the TaqMan PreAmp Master Mix (ref. 4488593; Applied Biosystems) combined with the corresponding Custom TaqMan PreAmp primer pool. The preamplified cDNA was either directly processed or stored at -20°C but for no longer than 64 hours. For quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), each of the 4 microfluidic card's ports were filled with 100 μ L of reaction volume from a master mix consisting of 225 μ L TaqMan Universal Master Mix II No UNG (ref. 4440048; Applied Biosystems), 4.5 μ L of preamplified and 1:4 diluted cDNA (at a concentration of 0.142 ng/ μ L), and nuclease-free water up to 450 μ L. The qRT-PCR was run on a 7900HT Fast Real-Time PCR instrument (ref. 4351405; Applied Biosystems) using the following conditions: hold for 10 minutes at 95°C, then 15 seconds at 95°C, and 1 minute at 60°C for 40 cycles. All qRT-PCR reactions were performed in duplicate for each sample and miRNA assay. Ct values were calculated from automatic threshold. RNU66, RNU48, RNU44, and RNU6b were initially included as endogenous controls for normalization, but data analysis showed that miR-30a-5p,

miR-30e, and miR-28 were more stably expressed across all samples and were therefore used as better controls for our study.

TaqMan MicroRNA Assays (ref. 4449142; Applied Biosystems) were used to validate differential miRNA expression in 97 samples by qRT-PCR. RNA was diluted to 4 ng/ μ L, and 10 ng was used as a template for each reverse-transcription reaction. All qRT-PCR reactions were performed on a ViiA 7 Real-Time PCR instrument (ref. 4453534; Applied Biosystems) in triplicate for each sample and miRNA. Thermal conditions were as follows: hold 10 minutes at 95°C, then 15 seconds at 95°C, and 1 minute at 60°C for up to 50 cycles to detect any expression possible. CT values were calculated from automatic threshold, and only those below 40 were regarded for final analysis. As in the discovery phase, miR-30a-5p, miR-30e, and miR-28 were used as endogenous controls.

Statistical analysis

Statistics of clinical and pathological characteristics were calculated with GraphPad Prism (version 9.1.2). The unpaired Student *t* test and Fisher exact test were used where applicable for differences between study groups. All statistics of experimental data including all plots were calculated and generated with R software. We did not perform an interplate normalization because the principal component analysis did not show a batch effect. Quantitative RT-PCR results were analyzed by standard 2-class unpaired Welch *t* test and ANOVA where applicable. Finally, for each selected miRNA, box and whisker plots and receiver operating characteristic (ROC) curves were generated, and the area under the curve (AUC) was analyzed to test the performance of the different models.

RESULTS

Characteristics of the study cohorts

Patients included in the discovery and validation cohorts presented similar distribution of sex and age at study inclusion and diagnosis between all cases and controls. However, for the discovery phase, patients of the study group were slightly younger (52 vs 57 years, *P* = 0.02), and advanced-stage tumors (III/IV) were twice as frequent in the UC-associated CRC group compared with the sporadic CRC group (41.6 vs 21%, respectively), but which was not statistically significant (Table 1). For a few patients in both study groups, more than 1 sample was available. Precisely, for 3 patients, 1 sample of normal mucosa and 1 sample of dysplasia were available; for 6 patients, 2 samples of dysplasia were available. By contrast, all samples of both control groups came from different patients, resulting in a total of 102 samples from 97 patients in the discovery cohort and 97 samples from 93 patients in the validation cohort. Regarding the group of UC-associated dysplasia, in the discovery cohort, 18 and 2 of 20 were low-grade and high-grade dysplasia, respectively, whereas in the validation cohort, 100% were low-grade dysplasia. All sporadic adenomas were tubular adenomas with low-grade dysplasia except for a single one in the discovery cohort that was a tubulovillous adenoma with high-grade dysplasia (Table 1 and Figure 1).

miRNAs are differentially expressed across the colitis-associated cancer sequence

We found 64 miRNAs that were differentially deregulated across the UC-associated CRC sequence, whereas 65 miRNAs were altered in the sporadic CRC sequence (see Supplementary Table S1, Supplementary Digital Content 1, <http://links.lww.com/CTG/A803>). We compared the 2 sequences of differentially expressed miRNAs

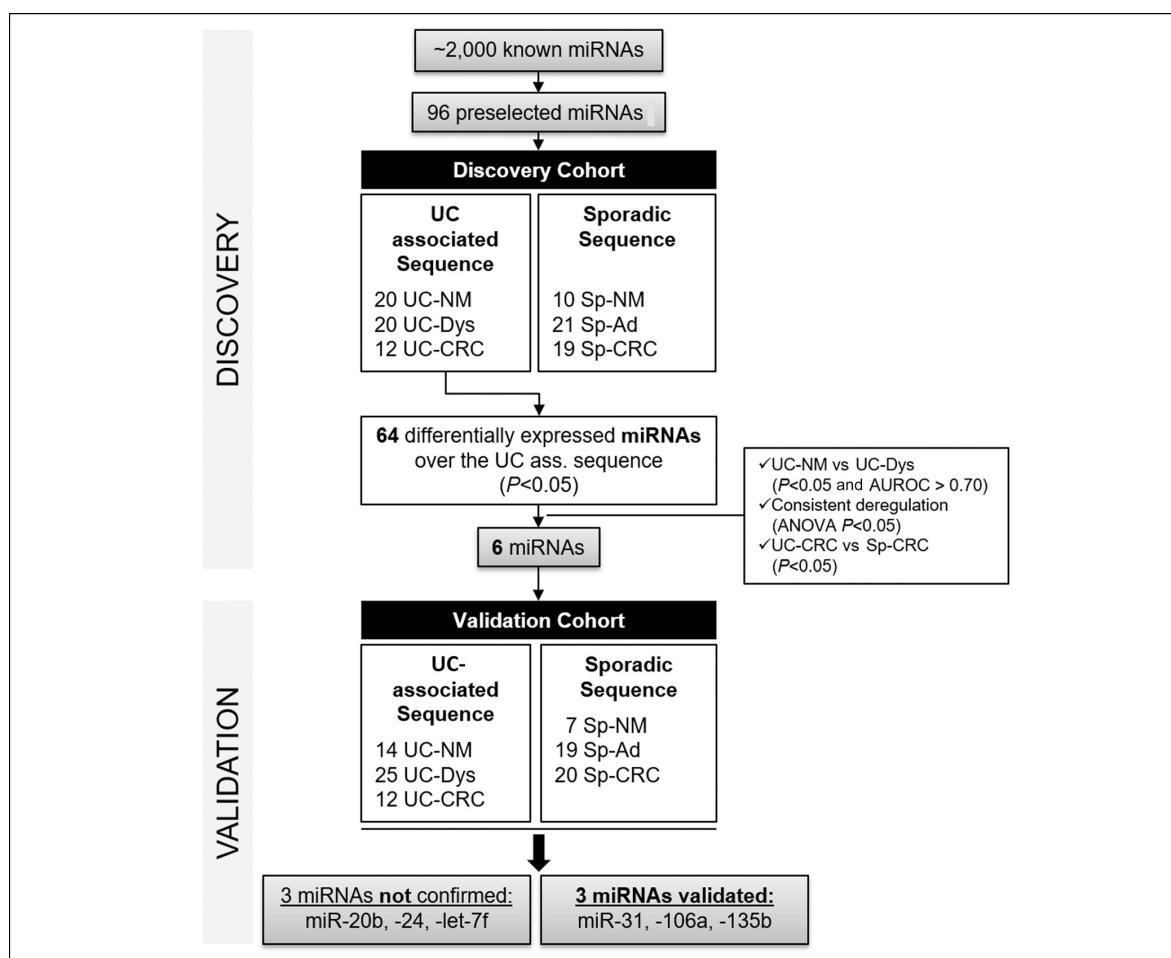


Figure 1. Study flowchart. AUROC, area under the receiver operating curve; Sp-Ad, sporadic adenoma; Sp-CRC, sporadic colorectal cancer; Sp-NM, sporadic normal mucosa; UC, ulcerative colitis; UC-CRC, ulcerative colitis-associated colorectal cancer; UC-Dys, ulcerative colitis-associated dysplasia; UC-NM, UC-associated normal mucosa.

(ANOVA $P < 0.05$) and found that most of the miRNAs were shared between the 2 sequences. However, we also found 9 miRNAs that were only differentially regulated in the UC-associated sequence, whereas 10 were only significant for the sporadic sequence (see Supplementary Table S1, Supplementary Digital Content 1, <http://links.lww.com/CTG/A803>). We next filtered the significantly deregulated miRNAs by those who showed the largest difference in relative expression levels between normal mucosa (UC-NM) and UC-associated CRC (UC-CRC). For a difference greater than ± 1.0 , we retrieved 21 miRNAs that were upregulated and 11 that were downregulated (see Supplementary Table S1, Supplementary Digital Content 1, <http://links.lww.com/CTG/A803>). Interestingly, within each group (i.e., upregulated and downregulated), they showed different types of change in expression level. For instance, within the upregulated group, although some were only overexpressed in the cancer or in the dysplasia with respect to normal mucosa, others showed a consistent upregulation across the UC-associated sequence (Figure 2). We also compared the miRNA expression profiles between UC-CRCs and Sp-CRCs and

retrieved 47 miRNAs that showed statistically significant differences between both entities. Thirty of these miRNAs showed a more than 2-fold difference, 9 of which were higher expressed in the UC-associated CRCs, whereas 21 were higher expressed in the sporadic CRCs (Figure 3a; see Supplementary Table S2, Supplementary Digital Content 2, <http://links.lww.com/CTG/A804>).

miRNAs are potential mucosal biomarkers for dysplasia in patients with ulcerative colitis

When compared with normal colonic mucosa of patients with UC, dysplastic lesions showed a distinct miRNA expression profile (Figure 3b; see Supplementary Table S3, Supplementary Digital Content 3, <http://links.lww.com/CTG/A805>). In accordance with our main objective of discovering tissue biomarkers for identification of dysplasia associated to UC and which at the same time were highly specific for neoplastic progression associated to UC rather than the sporadic adenoma-carcinoma sequence, we used the following criteria for selecting the miRNAs for the validation phase: (i) miRNAs

Table 1. Clinical characteristics of the patients within the different groups

	Discovery (N = 97)			Validation (N = 93)		
	Study group	Control group	P	Study group	Control group	P
Total patients, n	47	50		47	46	
Sex						
Female, n (%)	16 (34)	23 (46)	0.30	17 (36%)	23 (50)	0.21
Age						
Mean age at inclusion, yr (SD)	52 (13.8)	57 (3.1)	0.02	56 (12.2)	57 (3.5)	0.64
Mean age at diagnosis UC, yr (SD)	36 (18.4)	NA	NA	38 (14.1)	NA	NA
UC-associated dysplasia, n	20			25		
Low-grade/high-grade, n (%)	18/2 (90/10)			25/0 (100/0)		
Sporadic adenoma, n		21	0.61		19	0.99
Low-grade/high-grade, n (%)		20/1 (95/5)			19/0 (100/0)	
Sex						
Female, n (%)	7 (35)	9 (43)	0.75	10 (40)	10 (53)	0.54
Age						
Mean age at inclusion, yr (SD)	53 (13.0)	58 (0.8)	0.08	56 (12.9)	58 (1.2)	0.51
Mean age at diagnosis UC, yr (SD)	36 (14.6)	NA	NA	38 (14.7)	NA	NA
Carcinomas, n	12	19		12	20	
Sex						
Female, n (%)	3 (25)	9 (47)	0.27	5 (42)	9 (45)	0.99
Age						
Mean age at inclusion, yr (SD)	56.9 (16.4)	54.4 (2.9)	0.52	60 (12.8)	55 (2.7)	0.09
Mean age at diagnosis CRC, yr (SD)	57.8 (17.5)	54.4 (2.9)	0.42	58 (12.5)	55 (2.7)	0.32
Δt between diagnosis UC and CRC, yr (SD)	13.5 (11.3)	NA	NA	14.9 (9.3)	NA	NA
TNM, n (%)						
<i>In situ</i>	0 (0)	6 (31.6)		0 (0)	0 (0)	
I	2 (16.7)	9 (47.4)		4 (33.3)	9 (45)	
II	4 (33.3)	0 (0)		5 (41.7)	2 (10)	
			0.22			0.21
III	1 (8.3)	2 (10.5)		3 (25)	6 (30)	
IV	4 (33.3)	2 (10.5)		0 (0)	1 (5)	
Unknown	1 (8.3)	0 (0)		0 (0)	2 (10)	
Location ^a						
Proximal/distal, n (%)	3/8 (25/67)	2/17 (11/89)	0.33	3/6 (25/50)	5/15 (25/75)	0.67
Unknown	1 (8)	0 (0)		3 (25)	0 (0)	
Adjuvant treatment, n (%)						
Yes/no	5/5 (42/42)	4/15 (21/79)	0.20	9/3 (75/25)	11/9 (55/45)	0.45
Unknown	2 (16.7)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	

CRC, colorectal cancer; TNM, tumor, node, metastasis; UC, ulcerative colitis; NA, not applicable. P-values <0.05 are highlighted in bold.

^aProximal and distal to the splenic flexure.

that showed a significant deregulation between normal mucosa, dysplasia, and cancer, (ii) miRNAs that showed a consistent deregulation across the UC-associated sequence meaning that those miRNAs dysregulated in the dysplasia cases that did not show a dysregulation of higher magnitude in cancer were not regarded as meaningful, (iii) miRNAs with a significantly different expression

level in the colitis-associated cancers compared with the sporadic cancers (Figure 3A; see Supplementary Table S2, Supplementary Digital Content 2, <http://links.lww.com/CTG/A804>), and (iv) miRNAs that showed a differential expression between normal mucosa of patients with UC and UC-associated dysplasia (Figure 3B; see Supplementary Table S3, Supplementary Digital

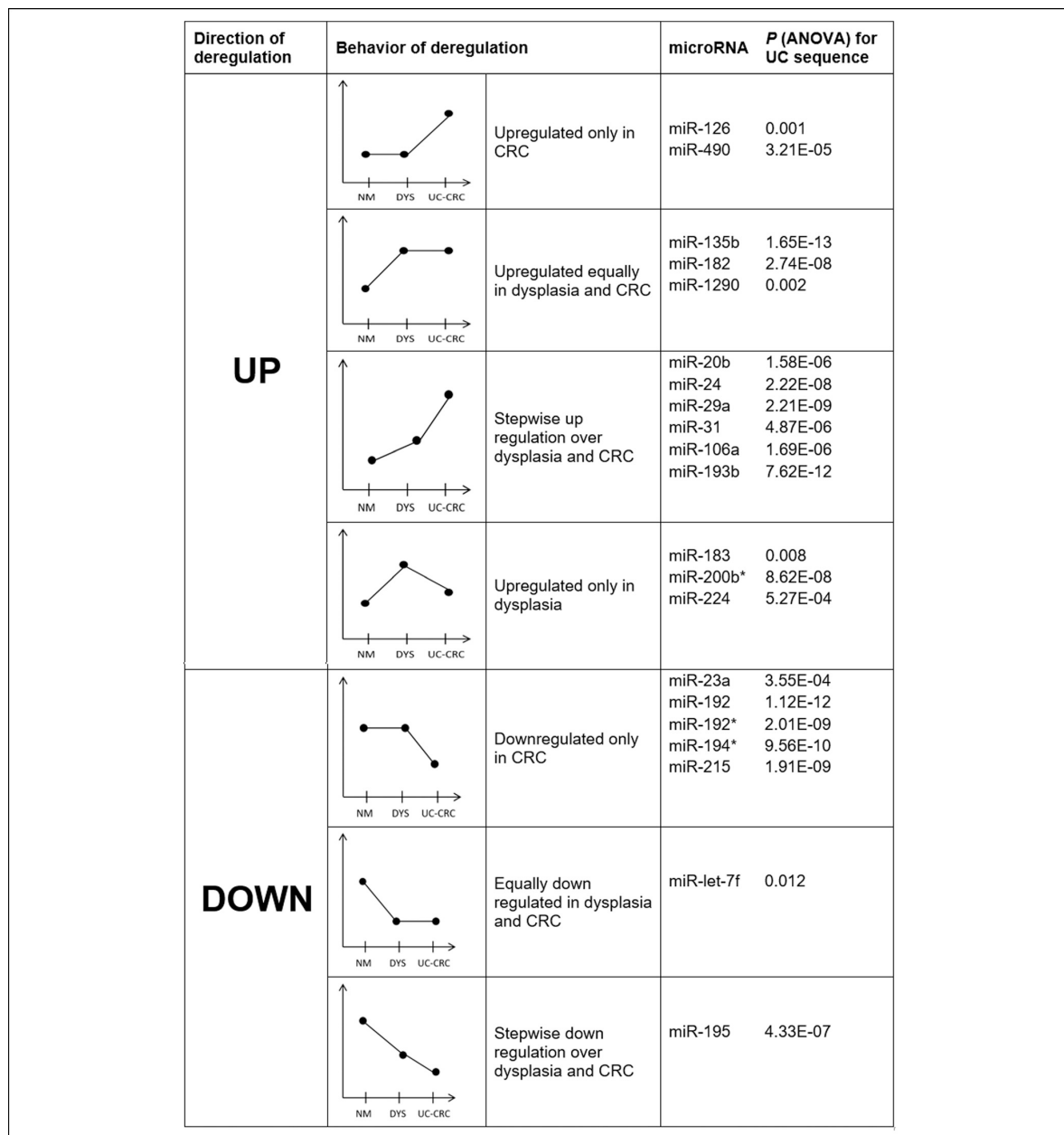


Figure 2. Behavior of selected differentially deregulated miRNAs across the UC-associated CRC sequence in the discovery phase. CRC, colorectal cancer; miRNA, microRNA; UC, ulcerative colitis.

Content 3, <http://links.lww.com/CTG/A805>). Accordingly, we only considered those miRNAs for which the levels of specificity according to their ROC curves were at least 0.7 or higher when discriminating dysplasia from corresponding normal mucosa.

We identified 6 miRNAs from the discovery phase that fulfilled each of these criteria: miR-20b, -24, -31, -106a, and -135b, all of which were upregulated across the sequence, and miR-let-7f, which was downregulated (Table 2).

Successful validation of the miRNA biomarkers in the validation cohort

The 6 miRNAs that fulfilled the above conditions were chosen for further validation. Moreover, we decided to include also miR-195 and miR-29a into the analysis because they also correlated well with carcinogenesis and were accurate discriminators for dysplasia, although failed to show statistically significant differences between sporadic and UC-associated cancer. As shown in Table 2

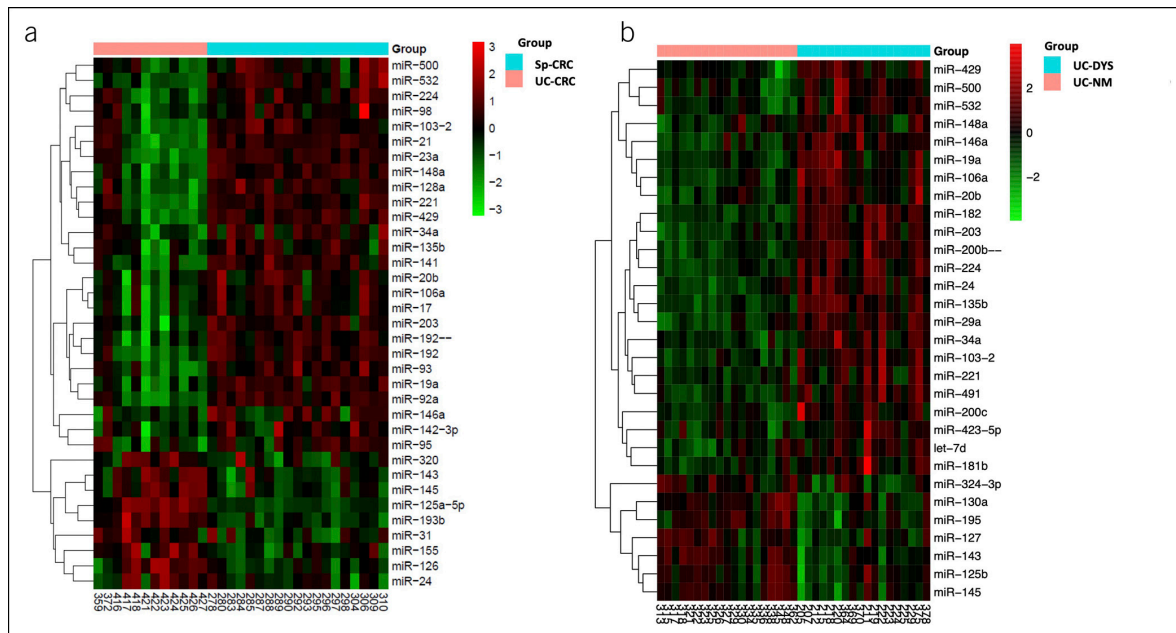


Figure 3. (a) Heatmap of selected microRNAs differentiating the expression patterns of UC-associated CRC (UC-CRC) in light blue and sporadic CRC (Sp-CRC) in pink. (b) Heatmap of selected microRNAs differentiating the expression patterns of UC-associated dysplasia (UC-DYS) in light blue and normal colonic mucosa of patients with UC (UC-NM) in pink.

(and Supplementary Table S4, Supplementary Digital Content 4, <http://links.lww.com/CTG/A806>), we positively validated the expression of 3 of 8 miRNAs: miR-31, -106a, and -135b, all of which were upregulated. Box plots and ROC curves of these 3 miRNAs are shown in Figure 4.

Contrarily, miR-195 showed a statistically significant down-regulation in dysplasia ($P = 0.0002$), but in the UC-CRC group, it was expressed at the same level as in normal mucosa ($P = 0.65$), results not consistent with those of the discovery phase (see Supplementary Figures S5, Supplementary Digital Content 5, <http://links.lww.com/CTG/A807>). On the other hand, miR-20b showed a consistent and statistically significant deregulation across the UC-associated and sporadic CRC sequences in both the discovery and validation cohort, but in the latter, it failed to show significant differences between the UC-CRC and Sp-CRC cases ($P = 0.11$) (Table 2). Finally, miR-24 did not show any differences across the UC-associated CRC sequence, and miR-29a and miR-let-7f did not show differences between normal mucosa and dysplasia (see Supplementary Table S4, Supplementary Digital Content 4, <http://links.lww.com/CTG/A806> and Supplementary Figures S5, Supplementary Digital Content 5, <http://links.lww.com/CTG/A807>).

DISCUSSION

CRC is still a severe and life-threatening complication of long-standing UC; thus, screening and early treatment of premalignant lesions are decisive to decrease morbidity and mortality. Current surveillance strategies aim to identify dysplasia by periodic colonoscopies; however, there are important difficulties to detect and diagnose dysplasia accurately, and colonoscopy is still an

invasive procedure, costly, and uncomfortable for patients. Therefore, there is a substantial need to find new biomarkers that can predict dysplasia or cancer noninvasively.

miRNAs represent a crucial part in the complex network of epigenetic regulation and have become potential biomarkers for UC-CRC. However, there is still a need to improve the diagnostic performance based on the detection of miRNAs species and validate the findings. Indeed, there have been previous attempts to distinguish IBD related to sporadic colonic neoplasia with some success, but observations are not consistent. Histological differentiation of colitis-associated CRC from sporadic CRC is not possible. Commonly, studies have considered those CRC arising in an area with known previous inflammation as colitis-associated CRC (24). Also, colitis-associated CRC is often labeled at biobanks as CRC without including any specification of their relationship with colitis, which makes their identification and differentiation from sporadic CRC difficult. We addressed this limitation in our study by including as UC-CRC only those cases that occurred in patients with known longstanding UC and that raised in areas with previous colitis (i.e., a proximal CRC in a patient with distal longstanding UC would not have been included in the study). Moreover, to ensure that our results would not be biased toward inflammation, we only included dysplasias and CRCs from patients with UC in clinical remission. We cannot exclude, however, that there was some degree of microscopic inflammation in some of the samples, but we believe that the impact was minimal. On the other hand, we recruited as sporadic CRCs only those cases diagnosed through a population-based CRC screening program in asymptomatic individuals where patients with IBD are specifically excluded.

One major strength of our study is that we mirror the pathophysiologic cascade of carcinogenesis of both the UC-CRC and

Table 2. Results for discovery phase and validation phase for 8 validated microRNAs (bold = positively validated)

miRNA	Discovery				Validation			
	UC-NM vs UC-Dys, Student <i>P</i>	UC-NM vs UC-Dys, AUROC	UC-CRC sequence, ANOVA <i>P</i>	UC-CRC vs Sp-CRC, Student <i>P</i>	UC-NM vs UC-Dys, Student <i>P</i>	UC-NM vs UC-Dys, AUROC	UC-CRC sequence, ANOVA <i>P</i>	UC-CRC vs Sp-CRC, Student <i>P</i>
let-7f	0.003	0.720	0.012	5.20E-04	0.707	0.554	0.006	0.384
miR-20b	2.92E-04	0.820	1.58E-06	0.005	0.016	0.734	3.10E-06	0.110
miR-24	1.60E-06	0.900	2.22E-08	0.045	0.199	0.620	0.140	7.26E-04
miR-29a	3.90E-07	0.920	2.21E-09	0.062	0.645	0.517	0.003	0.021
miR-31	0.002	0.760	4.87E-06	0.020	2.64E-04	0.774	1.90E-06	0.015
miR-106a	6.16E-06	0.900	1.69E-06	0.001	0.002	0.777	0.003	0.012
miR-135b	4.57E-09	0.960	1.65E-13	0.010	5.12E-08	0.923	4.40E-05	0.040
miR-195	8.42E-04	0.800	4.33E-07	0.611	1.45E-04	0.831	1.40E-04	2.44E-04

AUROC, area under the receiver operating curve; Sp-CRC, sporadic colorectal cancer; UC-CRC, ulcerative colitis-associated colorectal cancer; UC-Dys, ulcerative colitis-associated dysplasia; UC-NM, ulcerative colitis-associated normal mucosa.

Sp-CRC sequence by analyzing samples of the intermediate steps, i.e., dysplasia for UC-CRC and sporadic adenoma for Sp-CRC. By doing so, we found sixty-4 differentially deregulated miRNAs for the UC-CRC sequence, which is comparable with previous studies (20–22,25). We observed that most miRNAs were equally deregulated across the UC-CRC and Sp-CRC sequence, whereas some miRNA species were exclusively deregulated across the UC-CRC sequence, for instance, downregulated miR-192 and upregulated miR-126, indicating that although both processes share a wide range of common features, they have indeed distinct miRNA expression patterns. We also found miRNAs that were associated with both UC-CRC and Sp-CRC development but on statistically significant different levels (e.g., miR-31 being higher expressed in the UC-CRC sequence), which might reflect a different relevance for the carcinogenesis such as faster progression or higher grade of invasion or because of the underlying inflammation in UC-CRC. Hence, another strength of our study was that we considered these significantly different levels as one of the relevant criteria to select miRNAs for further validation.

The results of our study also suggest that miRNAs are linked to different stages of carcinogenesis. For example, miR-126 and -490 were only upregulated in cancer and not in dysplasia, suggesting they are late events, whereas others (e.g., miR-20b, -31, and -106a) seemed to be early events because they were already upregulated in the dysplasia yet on a lower level than in the cancer. We hypothesize that those miRNAs altered early during carcinogenesis and that maintain or further enhance this deregulation in cancer are of most interest as biomarkers because they could be an early predictor for a higher risk to develop cancer. In this study, more than 90% of UC-associated dysplasia were classified as low grade, whereas 95% of adenomas were tubular adenomas with low-grade dysplasia. Hence, the number of samples of high-grade dysplasia was too low to perform a subgroup analysis.

Our main goal was to find miRNAs to be as specific as possible for colitis-associated dysplasia that have a high potential for moving on to cancer. Therefore, we applied very restrictive criteria to identify candidate mucosal miRNA biomarkers that would not only accurately discriminate dysplasia from normal

mucosa but also indicate a higher risk of CRC and are differentially expressed in UC-CRC compared with Sp-CRC. Despite this narrow definition, we achieved to identify 6 candidates, 3 of which were positively validated in an independent cohort. All 3 validated miRNAs (i.e., miR-31, -106a, and -135b) have been previously described for various cancer types including CRC and have been associated with different cancer-related pathways such as RAS signaling for miR-31 (26) and Wnt/ β -catenin, PI3K/AKT, TGFBR2, and PTEN for miR-135 (27–30). Most intriguingly, miR-31 has been linked to IBD-associated CRC (21,31). On the other hand, miR-106a, whose role in cancer cell proliferation, migration, and invasion has been widely described for CRC (32), has also been proven to distinguish between CD and UC as well as to classify indeterminate IBD, but our findings also suggest a novel role of this miRNA in IBD-associated carcinogenesis (33). MiR-135, which has been proposed as a potential noninvasive biomarker in stool for sporadic CRC and advanced adenoma, has not shown any diagnostic value in patients with IBD so far, and therefore, its association with UC-CRC is a truly novel finding of our study (34).

Despite our promising results, we also acknowledge some limitations of our study. First, the number of samples is still limited; nevertheless, we were able to identify numerous highly relevant biomarker candidates and validated some of them. Second, the design of the study was retrospective, and the samples in the UC-CRC sequence were mostly derived from different patients, which does not allow inferring causality. Third, we did not correlate the results to clinical data, such as grade of inflammation, tumor stage, or disease-free survival, because these data were either not available or the retrospective design did not allow its usage.

In our opinion, the ideal future perspective for miRNAs as biomarkers is their utility as a nonminimally or minimally invasive screening method in blood, stool, or rectal biopsy to identify patients with a high chance of having premalignant or cancerous lesions. If tested positive, in a next step, patients would undergo colonoscopy-driven biopsies or resections to further evaluate and stratify according to individual risk profiles and better rationalize surveillance and treatment strategies.

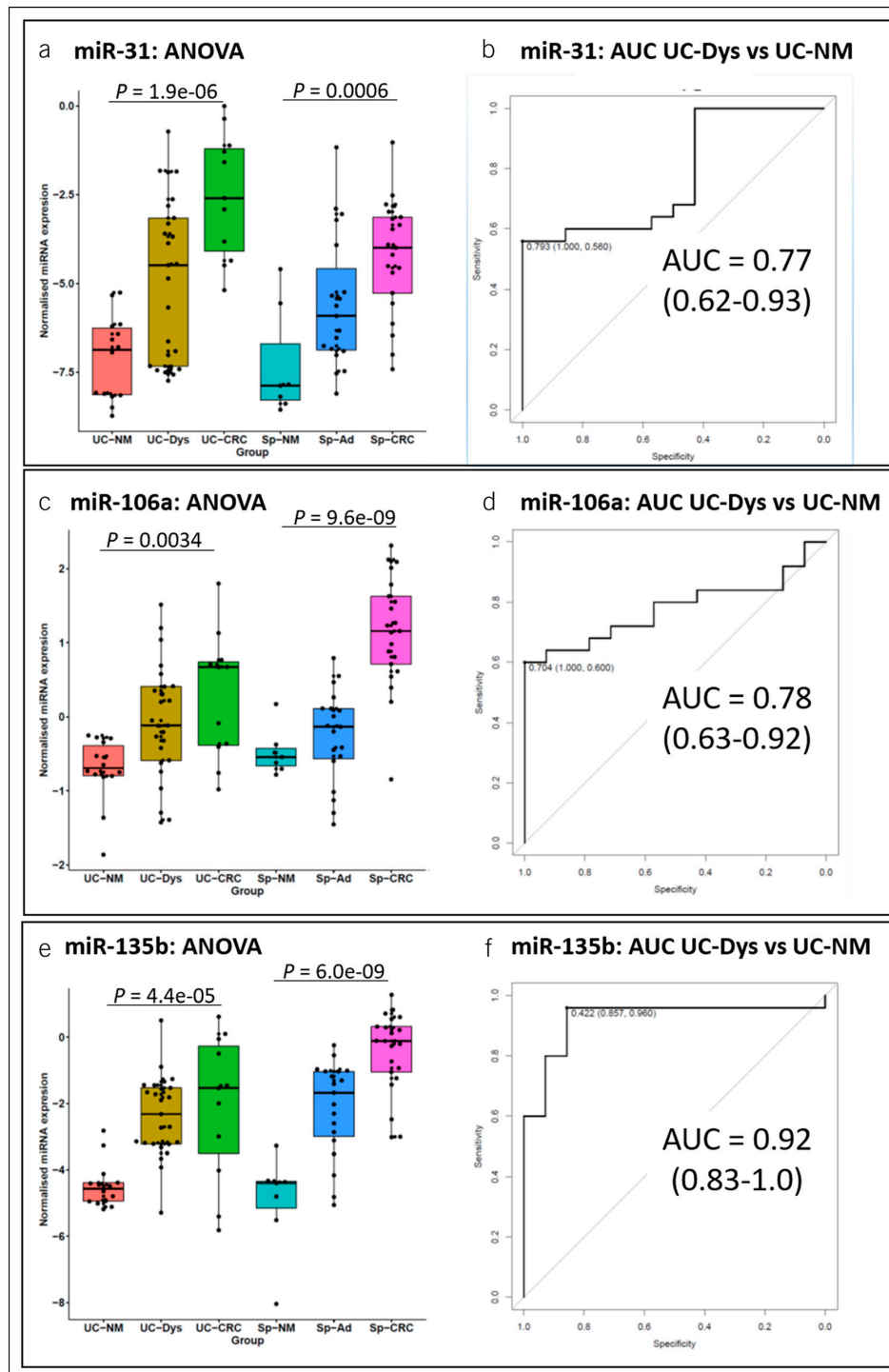


Figure 4. Left: Box and whisker plots for relative expression of validated microRNAs comparing the UC-associated (left) and the sporadic sequence (right): miRNA-31 (**a, b**), miR-106a (**c, d**), and miR-135b (**e, f**). Right: Sensitivities, specificities, and receiver operating curve for discriminating between normal mucosa and dysplasia of the ulcerative colitis cases. Sp-Ad, sporadic adenoma; Sp-CRC, sporadic CRC; Sp-NM, sporadic normal mucosa; UC-CRC, UC-associated colorectal cancer; UC-Dys, UC-associated dysplasia; UC-NM, ulcerative colitis-associated normal mucosa.

Our study revealed differentially expressed miRNAs for UC-associated dysplasia and cancer. Most importantly, some of these were found to be specific for colitis-associated compared with sporadic colorectal cancer. They were also further validated in an independent cohort. Based on our and previous results, future research should focus on developing and evaluating noninvasive miRNA panels until they are robust enough as diagnostic tools before entering further validation on a large scale in clinical settings.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data presented in this study are available in the supplementary tables.

CONFLICTS OF INTEREST

Guarantor of the article: Maria Pellisé, PhD.

Specific author contributions: Conceptualization, M.P., G.J., and I.Q.; methodology, M.P., I.Q., and J.C.; software, J.J.L. and J.S.; validation, G.J., I.Q., and J.J.L.; formal analysis, G.J., I.Q., J.J.L., J.S., and J.C.; investigation, G.J., I.Q., M.C., and J.C.; resources, L.B., M.I.V. E.Q., M.C., M.A., A.C., J.P., and E.R.; data curation, G.J., I.Q., M.J., S.C., and L.M.; writing—original draft preparation, G.J.; writing—review and editing, all authors; visualization, G.J.; supervision, L.M., E.R., F.B., and M.P.; project administration, I.Q. and M.P.; and funding acquisition, M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Financial support: This work was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI12/01481; PI19/01050). Project PI19/01050 is funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and co-funded by the European Union. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III and Beca Marató de TV3 (201932-30). Parts of this work were also supported by the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC) and by the Hospital Clínic's Premi Fi de Residència (G.J.). None of the funding parties has been involved in collection, analysis, and interpretation of the data.

Potential competing interests: F.B. and M.C. declare that they have received an honorarium for consultancy from Sysmex and Elsevier and speaker's fees from Norgine. M.P. declares that she has received research grants from Fujifilm, consultancy fee from Norgine, and speaker's fee from Olympus, Norgine, Casen Recordati, and Janssen. All other authors have nothing to disclose.

Ethical considerations: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by our Institutional Ethics Committee (CEIC) of Hospital Clínic of Barcelona by May 10 of 2012 (registered 2012/7567). Informed consent for surgical procedures, colonoscopy, biopsy, analysis of specimens, and participation in the study was obtained from all subjects involved in the study.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the Tumor Bank of the IDIBAPS Biobank for their support. We thank the patients for their participation. We thank our friend and colleague Montserrat Andreu García, professor at the Pompeu Fabra University (Barcelona) and former founder and leader of the Comprehensive Care Unit for Patients with Inflammatory Bowel Disease at the Department of Gastroenterology, University Hospital del Mar (Barcelona) for providing us with samples and for her invaluable academic advice.

Study Highlights

WHAT IS KNOWN

- ✓ Colorectal cancer (CRC) is a feared complication of ulcerative colitis (UC).
- ✓ Its prevention is based on endoscopic detection of dysplasia, but this strategy has important limitations.
- ✓ MicroRNAs (miRNAs) are important regulators of gene expression and are ideal biomarker candidates.
- ✓ miRNAs have been associated with sporadic and UC-associated CRC.

WHAT IS NEW HERE

- ✓ Sporadic and UC-associated CRCs have distinct miRNA expression patterns.
- ✓ miRNAs are potential biomarkers for dysplasia in patients with UC.
- ✓ Some miRNAs show a gradual increase during neoplastic progression in UC.
- ✓ MiR-31, -106a, and -135b have been validated as potential mucosal biomarker candidates for neoplastic progression.

REFERENCES

1. Stewenius J, Adnerhill I, Anderson H, et al. Incidence of colorectal cancer and all cause mortality in non-selected patients with ulcerative colitis and indeterminate colitis in Malmö, Sweden. *Int J Color Dis* 1995;10(2):117–22.
2. Manninen P, Karvonen AL, Huhtala H, et al. The risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel diseases in Finland: A follow-up of 20 years. *J Crohns Colitis* 2013;7(11):e551–7.
3. Söderlund S, Brandt L, Lapidus A, et al. Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2009;136(5):1561–7; quiz 1818–9.
4. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. *J Crohns Colitis* 2017;11(6):649–70.
5. Rutegård M, Palmqvist R, Stenling R, et al. Efficiency of colorectal cancer surveillance in patients with ulcerative colitis: 38 years' experience in a patient cohort from a defined population area. *Scand J Surg* 2017;106(2):133–8.
6. Eluri S, Parian AM, Limketkai BN, et al. Nearly a third of high-grade dysplasia and colorectal cancer is undetected in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2017;62(12):3586–93.
7. Moussata D, Allez M, Cazals-Hatem D, et al. Are random biopsies still useful for the detection of neoplasia in patients with IBD undergoing surveillance colonoscopy with chromoendoscopy? *Gut* 2018;67:616–24.
8. Sanduleanu S, Rutter MD. Interval colorectal cancers in inflammatory bowel disease: The grim statistics and true stories. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2014;24(3):337–48.
9. Melville DM, Jass JR, Morson BC, et al. Observer study of the grading of dysplasia in ulcerative colitis: Comparison with clinical outcome. *Hum Pathol* 1989;20(10):1008–14.
10. Neumann H, Vieth M, Langner C, et al. Cancer risk in IBD: How to diagnose and how to manage DALM and ALM. *World J Gastroenterol* 2011;17(27):3184–91.
11. Hirata I. The present status and problems with diagnosis and management of dysplasia/colitic cancer in ulcerative colitis. *Clin J Gastroenterol* 2008;1(4):139–44.
12. Chen R, Lai LA, Brentnall TA, et al. Biomarkers for colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22(35):7882–91.
13. Guo Y, Bao Y, Yang W. Regulatory miRNAs in colorectal carcinogenesis and metastasis. *Int J Mol Sci* 2017;18(4):890.
14. Rahmani F, Avan A, Hashemy SI, et al. Role of Wnt/β-catenin signaling regulatory microRNAs in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Cell Physiol* 2018;233(2):811–7.

15. Strubberg AM, Madison BB. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: Pathways and clinical implications. *Dis Model Mech* 2017;10(3):197–214.
16. Hutchison J, Cohen Z, Onyeagucha BC, et al. How microRNAs influence both hereditary and inflammatory-mediated colon cancers. *Cancer Genet* 2013;206(9–10):309–16.
17. Bocchetti M, Ferraro M, Ricciardiello F, et al. The role of microRNAs in development of colitis-associated colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(8):3967.
18. James J, Riis L, Malham M, et al. MicroRNA biomarkers in IBD-differential diagnosis and prediction of colitis-associated cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21(21):1–19.
19. Chapman CG, Pekow J. The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: A review. *Therap Adv Gastroenterol* 2015;8(1):4–22.
20. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, et al. Differential microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Hum Mutat* 2012;33(3):551–60.
21. Oлару AV, Selaru FM, Mori Y, et al. Dynamic changes in the expression of MicroRNA-31 during inflammatory bowel disease-associated neoplastic transformation. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17(1):221–31.
22. Oлару AV, Yamanaka S, Vazquez C, et al. MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19(3):471–80.
23. Schroeder K, Tremaine W, Ilstrup D. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;317(26):1625–9.
24. Sebastian S, Hernández V, Myreliid P, et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). *J Crohns Colitis* 2014;8(1):5–18.
25. Tan YG, Zhang YF, Guo CJ, et al. Screening of differentially expressed microRNA in ulcerative colitis related colorectal cancer. *Asian Pac J Trop Med* 2013;6(12):972–6.
26. Sun D, Yu F, Ma Y, et al. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RAS1). *J Biol Chem* 2013;288(13):9508–18.
27. Valeri N, Braconi C, Gasparini P, et al. MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer Cell* 2014;25(4):469–83.
28. Liu B, Liu Y, Zhao L, et al. Upregulation of microRNA-135b and microRNA-182 promotes chemoresistance of colorectal cancer by targeting ST6GALNAC2 via PI3K/AKT pathway. *Mol Carcinog* 2017;56(12):2669–80.
29. Li J, Liang H, Bai M, et al. miR-135b promotes cancer progression by targeting transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) in colorectal cancer. *PLoS One* 2015;10(6):e0130194.
30. Xiang S, Fang J, Wang S, et al. MicroRNA135b regulates the stability of PTEN and promotes glycolysis by targeting USP13 in human colorectal cancers. *Oncol Rep* 2015;33(3):1342–8.
31. Liu Z, Bai J, Zhang L, et al. Conditional knockout of microRNA-31 promotes the development of colitis associated cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;490(1):62–8.
32. Feng B, Dong TT, Wang LL, et al. Colorectal cancer migration and invasion initiated by microRNA-106a. *PLoS One* 2012;7(8):e43452.
33. Lin J, Cao Q, Zhang J, et al. MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease. *Mod Pathol* 2013;26(1):148–54.
34. Wu W, Wang Z, Yang P, et al. MicroRNA-135b regulates metastasis suppressor 1 expression and promotes migration and invasion in colorectal cancer. *Mol Cell Biochem* 2014;388(1–2):249–59.

Open Access This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

3.2. Resultados del Segundo Proyecto

El Análisis Panepigenómico de la Metilación del ADN en Mucosa Normal Identifica la Hipermetilación del *HLA-F* como un Nuevo Biomarcador Candidato para el Síndrome de Poliposis Serrada

Epigenome-wide DNA Methylation Profiling of Normal Mucosa Reveals *HLA-F*
Hypermethylation as a Biomarker Candidate for Serrated Polyposis Syndrome

Artículo Original

Gerhard Jung^{1,2,3,4*}, **Eva Hernández-Illán**^{2*}, **Juan José Lozano**^{3,5}, **Julia Sidorova**^{3,5}, **Jenifer Muñoz**^{2,3},
Yasuyuki Okada^{7,8}, **Enrique Quintero**⁹, **Goretti Hernandez**⁹, **Rodrigo Jover**¹⁰, **Sabela Carballal**^{1,2,3,4},
Miriam Cuatrecasas^{2,3,4,6}, **Lorena Moreno**^{1,2,3,4}, **Mireia Diaz**^{1,2,3,4}, **Teresa Ocaña**^{1,2,3,4}, **Ariadna**
Sánchez^{1,2,3,4}, **Liseth Rivero**^{1,2,3,4}, **Oswaldo Ortiz**^{1,2,3,4}, **Joan Llach**^{1,2,3,4}, **Antoni Castells**^{1,2,3,4}, **Maria**
Pellisé^{1,2,3,4}, **Ajay Goel**^{7,11}, **Eduard Batlle**¹², **Francesc Balaguer**^{1,2,3,4#}

J Mol Diagn. 2022 Jun;24(6):674-686. doi: 10.1016/j.jmoldx.2022.03.010. Epub 2022 Apr 18.
PMID: 35447336; PMCID: PMC9228001.

¹ Gastroenterology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

² Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

⁴ Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵ Bioinformatics Platform, CIBEREHD, Barcelona, Spain

⁶ Pathology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷ Department of Molecular Diagnostics and Experimental Therapeutics, Beckman Research Institute, Biomedical Research Center, Monrovia, CA, USA

⁸ Department of Gastroenterology and Oncology, Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan

⁹ Department of Gastroenterology, University Hospital of the Canary Islands, Santa Cruz de Tenerife, Spain

¹⁰ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria ISABIAL, Alicante, Spain

¹¹ City of Hope Comprehensive Cancer Center, Duarte, CA, USA

¹² Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain

*Ambos autores contribuyeron igualmente. #Autor correspondiente.

Resumen (traducción):

El síndrome de poliposis serrada (SPS) se asocia con un alto riesgo de CCR. La hipermetilación intensa de los promotores es un hallazgo molecular frecuente en la vía serrada y puede estar presente en la mucosa normal que predispone a la formación de lesiones serradas. Para identificar nuevos biomarcadores para el SPS, se analizaron muestras frescas congeladas de mucosa normal de 50 pacientes con SPS y 19 individuos sanos utilizando la tecnología 850K *BeadChip* (Illumina). Los niveles de metilación aberrante se correlacionaron con la expresión génica utilizando una herramienta de análisis del transcriptoma de nueva generación. Se realizaron dos pasos de validación en cohortes independientes: primero, en tejido de mucosa normal fijado en formalina e incluido en parafina; y segundo, sobre 24 lesiones serradas. Los genes hipermetilados con mayor frecuencia fueron *HLA-F*, *SLFN12*, *HLA-DMA* y *RARRES3*; y los genes hipometilados con mayor frecuencia fueron *PIWIL1* y *ANK3* ($\Delta\beta = 10\%$; $P < 0,05$). Los niveles de expresión de *HLA-F*, *SLFN12* y *HLA-DMA* fueron significativamente diferentes entre pacientes con SPS e individuos sanos y correlacionaron bien con el estado de metilación del gen correspondiente (aumento $>20\%$; $r > 0,55$; $P < 0,001$). También se encontró una hipermetilación significativa de los sitios CpG en el cuerpo del gen *HLA-F* en lesiones serradas ($\Delta\beta = 23\%$; tasa de descubrimiento falso = 0,01). El estudio panepigenómico de metilación ha revelado numerosos CpG diferencialmente metilados en mucosa normal de pacientes con SPS. La hipermetilación significativa de *HLA-F* es un nuevo candidato como biomarcador para el SPS.

PDF del artículo: ver siguiente página.



Epigenome-Wide DNA Methylation Profiling of Normal Mucosa Reveals *HLA-F* Hypermethylation as a Biomarker Candidate for Serrated Polyposis Syndrome

Gerhard Jung,^{*,†‡§} Eva Hernández-Illán,[†] Juan J. Lozano,^{†¶} Julia Sidorova,^{†¶} Jenifer Muñoz,^{†‡} Yasuyuki Okada,^{||**} Enrique Quintero,^{††} Goretti Hernandez,^{††} Rodrigo Jover,^{††} Sabela Carballal,^{*,†‡§} Miriam Cuatrecasas,^{†‡§,§§} Lorena Moreno,^{*,†‡§} Mireia Diaz,^{*,†‡§} Teresa Ocaña,^{*,†‡§} Ariadna Sánchez,^{*,†‡§} Liseth Rivero,^{*,†‡§} Oswaldo Ortiz,^{*,†‡§} Joan Llach,^{*,†‡§} Antoni Castells,^{*,†‡§} Maria Pellisé,^{*,†‡§} Ajay Goel,^{||¶¶} Eduard Batlle,^{||||} and Francesc Balaguer^{*,†‡§}

From the Gastroenterology Department* and the Pathology Department,^{§§} Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer,[†] Barcelona, Spain; the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD),[‡] Barcelona, Spain; the Faculty of Medicine,[§] University of Barcelona, Barcelona, Spain; the Bioinformatics Platform,[¶] CIBEREHD, Barcelona, Spain; the Department of Molecular Diagnostics and Experimental Therapeutics,^{||} Beckman Research Institute, Biomedical Research Center, Monrovia, California; the Department of Gastroenterology and Oncology,^{**} Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan; the Department of Gastroenterology,^{††} University Hospital of the Canary Islands, Santa Cruz de Tenerife, Spain; the Servicio de Medicina Digestiva,^{††} Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, Spain; the City of Hope Comprehensive Cancer Center,^{¶¶} Duarte, California; and the Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona),^{||||} The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain

Accepted for publication
March 4, 2022.

Address correspondence to
Francesc Balaguer, M.D.,
Ph.D., Hospital Clínic, Carrer
Villarroel 170, 08036
Barcelona, Spain.
E-mail: fprunes@clinic.cat.

Serrated polyposis syndrome (SPS) is associated with a high risk for colorectal cancer. Intense promoter hypermethylation is a frequent molecular finding in the serrated pathway and may be present in normal mucosa, predisposing to the formation of serrated lesions. To identify novel biomarkers for SPS, fresh-frozen samples of normal mucosa from 50 patients with SPS and 19 healthy individuals were analyzed by using the 850K BeadChip Technology (Illumina). Aberrant methylation levels were correlated with gene expression using a next-generation transcriptome profiling tool. Two validation steps were performed on independent cohorts: first, on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of the normal mucosa; and second, on 24 serrated lesions. The most frequently hypermethylated genes were *HLA-F*, *SLFN12*, *HLA-DMA*, and *RARRES3*; and the most frequently hypomethylated genes were *PIWIL1* and *ANK3* ($\Delta\beta = 10\%$; $P < 0.05$). Expression levels of *HLA-F*, *SLFN12*, and *HLA-DMA* were significantly different between SPS patients and healthy individuals and correlated well with the methylation status of the corresponding differentially methylated region (fold change, $>20\%$; $r > 0.55$; $P < 0.001$). Significant hypermethylation of CpGs in the gene body of *HLA-F* was also found in serrated lesions ($\Delta\beta = 23\%$; false discovery rate = 0.01). Epigenome-wide methylation profiling has revealed numerous differentially methylated CpGs in normal mucosa from SPS patients. Significant hypermethylation of *HLA-F* is a novel biomarker candidate for SPS. (*J Mol Diagn* 2022, 24: 674–686; <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.03.010>)

Supported by the Instituto de Salud Carlos III through the projects PI16/00766 and PI19/01867 (cofunded by European Regional Development Fund/European Social Fund; A way to make Europe/Investing in your future); supported by the Spanish Association of Gastroenterology (Asociación Española de Gastroenterología); in part cofunded by the Hospital Clínic's Premi Fi de Residència (G.J.) and by the public Catalan Health Department, Generalitat de Catalunya, Departament de Salut (PERIS 2019-2021), resolution SLT/3104/2018 (G.J.); and supported by the National

Cancer Institute, NIH, grants CA72851, CA184792, CA187956, and CA202797 (A.G.).

G.J. and E.H.-I. contributed equally to this work.

Disclosures: F.B. has received an honorarium for consultancy from Sysmex, is Editor of the journal *Gastroenterología y Hepatología* (published by Elsevier), and has received speaker's fees from Norgine. The other authors declare no competing interests.

Serrated polyposis syndrome (SPS) is characterized by the presence of multiple and/or large serrated polyps along the colorectum. According to the 2019 updated World Health Organization definition, at least one of the following two criteria need to be fulfilled to establish the diagnosis of SPS: at least five serrated polyps proximal to the rectum, of which at least two are ≥ 10 mm; and >20 serrated polyps of any size along the colon, of which at least five are located proximal to the rectum.¹ Serrated polyposis syndrome is currently perceived as a highly relevant disease because of three reasons: first, with increasingly implemented colorectal cancer (CRC) screening programs, the prevalence of SPS seems to be much higher than previously assumed (approximately 1 in 200 screening colonoscopies in fecal occult blood test screening programs)²; second, given their morphologic characteristics (pale, small, flat, and often covered by mucus), serrated lesions are often missed and the prevalence of SPS is likely even higher than the actual reported³; and, third, SPS has been associated with a higher risk for developing CRC and therefore surveillance programs need to be implemented.^{4–6}

In addition to the long-known adenoma-carcinoma sequence, around 10% to 15% of all sporadic CRCs are believed to arise from the serrated pathway, with the serrated lesion as their precursor.^{7,8} However, the enormous phenotypic, genomic, and epigenomic heterogeneity of serrated lesions is posing a challenge in sorting out the underlying molecular mechanisms, which are still widely unknown. In this sense, the serrated pathway can arise from hyperplastic polyps (HPs), sessile serrated lesions (SSLs), and traditional serrated adenomas, and all show different morphologic characteristics and molecular features. In addition, some SSLs might progress to serrated adenocarcinoma, whereas others develop as conventional CRC with histologic and molecular features of microsatellite instability high cancers.⁹ Nonetheless, one common histologic feature of all the subtypes is the saw-tooth shape of the crypt base, which is believed to arise from altered apoptotic pathways.^{10,11} Serrated polyposis syndrome has been associated with hypermethylation of multiple gene promoters. In a study published in 2006, Minoo et al¹² analyzed the DNA methylation at promoters of 14 markers and found a higher methylation level in patients with SPS compared with those with serrated lesions but without fulfilling criteria for SPS. More important, these differences were even more evident when normal mucosa was analyzed.¹² More recent studies have shown that, compared with conventional adenomas, SSLs show more hypermethylation, particularly in CpG islands and shores.¹³ In addition, an important fraction of serrated CRCs present the so-called CpG island methylator phenotype (CIMP), and this is associated to various molecular features and risk factors, including *BRAF* mutation, microsatellite instability, proximal tumor site, female sex, older age, and smoking.¹⁴ Another frequent finding of sporadic CRCs, overlapping with the serrated pathway, is the presence of microsatellite instability secondary to *MLH1*

promoter hypermethylation.¹² A third molecular mechanism hypothesized to initiate the serrated pathway is based on activating mutations in the mitogen-activated protein kinase pathway. Particularly, *BRAF* mutations have been associated with a high level of promoter methylation and *MLH1* silencing.^{15,16}

The observation that patients with a history of colorectal polyps or cancer are more likely to develop metachronous lesions than those without such previous lesions has led to the field cancerization (or field defect) hypothesis.^{17,18} Thus far, some genetic and epigenetic alterations have been identified that arise in the colonic epithelium in a patchy way (fields) and predispose to the formation of polyps and eventually cancer, yet the mucosa appears macroscopically and microscopically normal.¹⁹ This has become particularly evident for proximal serrated lesions where aberrant DNA methylation of a specific gene panel (CIMP panel) detected in normal mucosa was associated with the presence of advanced proximal serrated lesions.²⁰ From a clinical viewpoint, it has been proposed that these aberrations in normal mucosa could be leveraged as a tool to identify patients early at risk for harboring or developing lesions.¹² However, the clinical implications of this hypothesis remain largely unexplored.

Intense colonoscopy surveillance for SPS is costly and uncomfortable for patients. Besides, recent studies suggest that the risk of developing cancer under surveillance is low and that lower-risk patients could benefit from relaxation of the intervals.⁵ To optimize patient management, it is clear that we first need to better understand the molecular fundamentals of the serrated pathway to then dispose of molecular biomarkers for a better cancer risk prediction.

This study describes the methylation profile of normal mucosa in a large cohort of SPS and identified biomarker candidates for SPS. We also aimed to verify the field defect hypothesis by comparing the methylation profiles found in normal mucosa and in serrated polyp tissue.¹⁸

Materials and Methods

Study Design

This study consisted of four phases (Figure 1). In the exploratory phase, a genome-wide methylation analysis was performed using the 850K Epic BeadChip Array (Illumina) in fresh-frozen tissue samples of normal colon mucosa from 50 patients diagnosed with SPS and 19 individuals without colorectal neoplasia. Because aberrant methylation has been shown to differ along the colorectum,²¹ samples from the proximal and distal colon were obtained. Proximal colon was defined as proximal to the splenic flexure. The gene expression was then analyzed in the same cohort and samples and the expression levels were correlated with the methylation status of the corresponding differentially methylated regions (DMRs). In the next step, the results in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples of

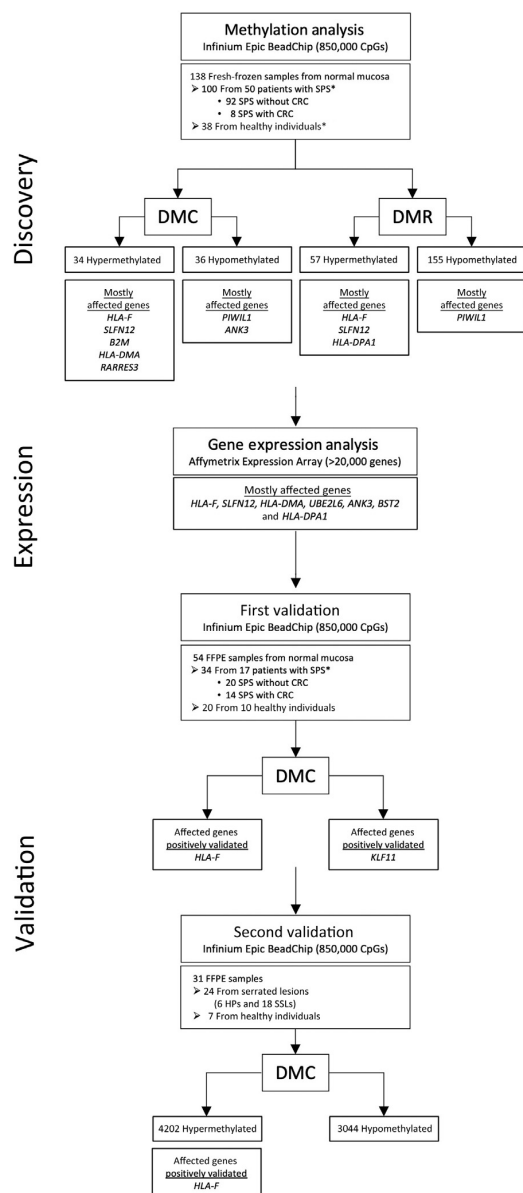


Figure 1 Study flowchart. *From each patient, one sample from the proximal colon and one sample from the distal colon were obtained. CRC, colorectal cancer; DMC, differentially methylated CpG; DMR, differentially methylated region; FFPE, formalin fixed, paraffin embedded; HP, hyperplastic polyp; SSL, sessile serrated lesion; SPS, serrated polyposis syndrome.

the normal mucosa of an independent cohort of 17 SPS patients and 10 individuals without colorectal neoplasia were validated. As a further validation step, genome-wide methylation analysis was performed using the same technique to interrogate differentially methylated CpGs directly in FFPE tissue of serrated lesions derived from another independent cohort: 6 HPs and 18 SSLs.

Study Population

Patients with SPS for the exploratory phase were prospectively recruited between 2016 and 2018 at the High-Risk CRC Clinic from the Hospital Clinic of Barcelona (Barcelona, Spain). For the validation cohort, patients were recruited retrospectively from the same clinic attended between 2004 and 2016.

Patients included in this study fulfilled criterion I and/or III, according to the 2010 World Health Organization criteria: criterion I, five or more serrated polyps proximal to the sigmoid and at least two of them measure ≥ 10 mm; and criterion III, ≥ 20 serrated polyps of any size at any localization.

Healthy controls with a normal colonoscopy (ie, without any adenoma, serrated lesion, or any other lesion) in the exploratory and validation phase derived from the CRC screening programs at the General Hospital of Alicante and the Hospital Clinic of Barcelona, respectively. In both cases, they were matched for age and sex with the study cohorts. Briefly, in these average risk, population-based screening programs, asymptomatic residents, aged 50 to 69 years, are identified by the community health registry and invited for CRC screening based on fecal immunochemical testing.²² In those with a positive result (>155 ng Hb/mL; OC-SENSOR; Eiken Chemical Co., Taito-ku, Tokyo, Japan), a colonoscopy is performed. In this program, patients with a history of CRC, adenoma, inflammatory bowel disease, family history of hereditary or familial CRC, severe comorbidity, or previous colectomy are excluded, because these patients are considered high risk and may be under different programs of surveillance or screening. Those patients with a normal colonoscopy (ie, without any pathology) were eligible to serve as healthy controls for the present study, and biopsies from the proximal and distal colon were taken.

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Informed consent was retrieved from all patients, and the study was approved by our local ethics committee by February 29, 2016 (registered HCB/2016/0099).

Tissue Samples

Fresh-Frozen Samples (Exploratory Cohort)

Fresh-frozen normal mucosa tissue samples (from the proximal and distal colon) from patients with SPS were obtained during the surveillance colonoscopies.^{1,23} After the biopsy, samples were stored in RNAlater solution (reference AM7021; Invitrogen, Waltham, MA) at -80°C in the freezer at the laboratories of Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (Barcelona, Spain).

FFPE Samples (Validation Cohort)

FFPE tissue samples of normal mucosa from patients who had previously received partial or total colectomy because

of SPS with ($N = 7$) or without ($N = 10$) CRC were obtained. Samples were collected from the proximal and distal colon. An expert pathologist (M.C.) confirmed histologically that the sample only contained normal mucosa and not tumor or serrated lesions. The epithelial compartment comprised about 80% to 90% of each sample and therefore microdissection was not performed.

Tissue Samples from Serrated Lesions

Serrated polyp samples that were enrolled as a second validation step were obtained by endoscopic mucosal resection between 2014 and 2018. Each serrated polyp was classified as HP and SSL to the World Health Organization classification.

DNA and RNA Extraction

Fresh-frozen samples were disaggregated by using UFO beads (Stainless Steel UFO Beads 3.5 mm RNase free; reference F7SSUFO35-RNA; Cultek, Madrid, Spain) and the TissueLyser LT (reference 85600; Qiagen, Hilden, Germany). Genomic DNA from the tissue samples was extracted using the PureLink Genomic DNA MiniKit following the manufacturer's instructions (reference K1820-02; Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

Table 1 Study Population

Characteristic	SPS group	Healthy controls
Discovery Phase		
Total, n	50	19
Age, mean (SD), years	59 (7.5)	62 (4.9)
Sex: female, n (%)	19 (38)	6 (32)
Tobacco use, n (%)		
Smoker	26 (52)	4 (21)
Nonsmoker	13 (26)	3 (16)
Unknown	11 (22)	12 (63)
2010 WHO subtype, N (%)		NA
I	15 (30)	
III	15 (30)	
I + III	20 (40)	
CRC, n (%)	4 (8)	NA
Validation Phase		
Total, N	17	10
Age, mean (SD), years	60 (5.0)	62 (6.4)
Sex: female, n (%)	9 (53)	6 (60)
Tobacco use, n (%)		
Smoker	10 (59)	7 (70)
Nonsmoker	3 (18)	3 (30)
Unknown	4 (23)	0 (0)
2010 WHO subtype, n (%)		NA
I	4 (24)	
III	6 (35)	
I + III	7 (41)	
CRC, n (%)	7 (41)	NA

CRC, colorectal cancer; NA, not applicable; SPS, serrated polyposis syndrome; WHO, World Health Organization.

The double-stranded DNA concentration was measured by a fluorometric method (Qubit 3.0; reference Q33216; Invitrogen). For gene expression analysis, RNA was extracted using the Rneasy miniKit following the manufacturer's instructions (reference 74104; Qiagen). Quality and quantity of RNA samples were measured on an automated electrophoresis TapeStation System Device (RNA ScreenTape Analysis; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The extracted DNA and RNA were then stored at -20°C and -80°C , respectively, which allowed adequate preservation of the quality of DNA and RNA for subsequent analysis of methylation and gene expression, respectively.

Human Methylation 850K Epic BeadChip Array

Global methylome analysis was performed by using an 850K Epic BeadChip Array (reference WG-317-1003; Illumina, San Diego, CA). This kit targets $>850,000$ CpG sites on a single-nucleotide level and covers CpGs located in CpG islands and outside of islands (ie, in shores and opensea areas). A CpG island is defined as a region of 500 to 2000 nucleotides, of which $>55\%$ are CpGs. The shores extend around 2000 bp upstream and downstream from the islands, whereas opensea represents areas with CpGs not related to CpG islands and that have a low CpG content. On the other hand, the 850K Epic BeadChip Array (Infinium) covers CpGs located in promoter regions but also in gene bodies and intergenic regions. Promoter regions of miRNAs were also covered.

In the case of the FFPE samples, the Infinium HD FFPE DNA Restore Kit (reference WG-321-1002; Illumina) was used previously to allow DNA recovery for the subsequent analysis using the Infinium platform.²⁴ Briefly, 1 μg of DNA was treated with sodium bisulfite (EZ DNA Methylation-Gold kit; reference D5005; Zymo Research, Tustin, CA). Subsequently, an isothermal amplification was performed at 37°C , followed by enzymatic fragmentation, purification, and hybridization (all according to the manufacturer's instructions).

The sets of methylation data were extracted using the GenomeStudio software v2011.1 (Illumina). Methylation values for individual CpG sites were obtained as β -values, calculated as the ratio of the methylated signal intensity/the sum of both methylated and unmethylated signals after background subtraction. The β -values were reported as a DNA methylation score, ranging from 0 (completely unmethylated) to 1 (completely methylated). To correct for the bias introduced by different bead types in the methylation array, a β -mixture quantile normalization method, described by Teschendorff et al²⁵ (2013), and which is included in the R package Chip Analysis Methylation Pipeline (ChAMP) for Infinium Illumina EPIC chips was used.²⁶ The batch effect was corrected by using the open-source Bioconductor package ChAMP version 2.8.9 with default parameters.²⁷ This R package also generates the gene set enrichment analysis and DMR analysis (ie, differentially methylated regions). A differentially methylated

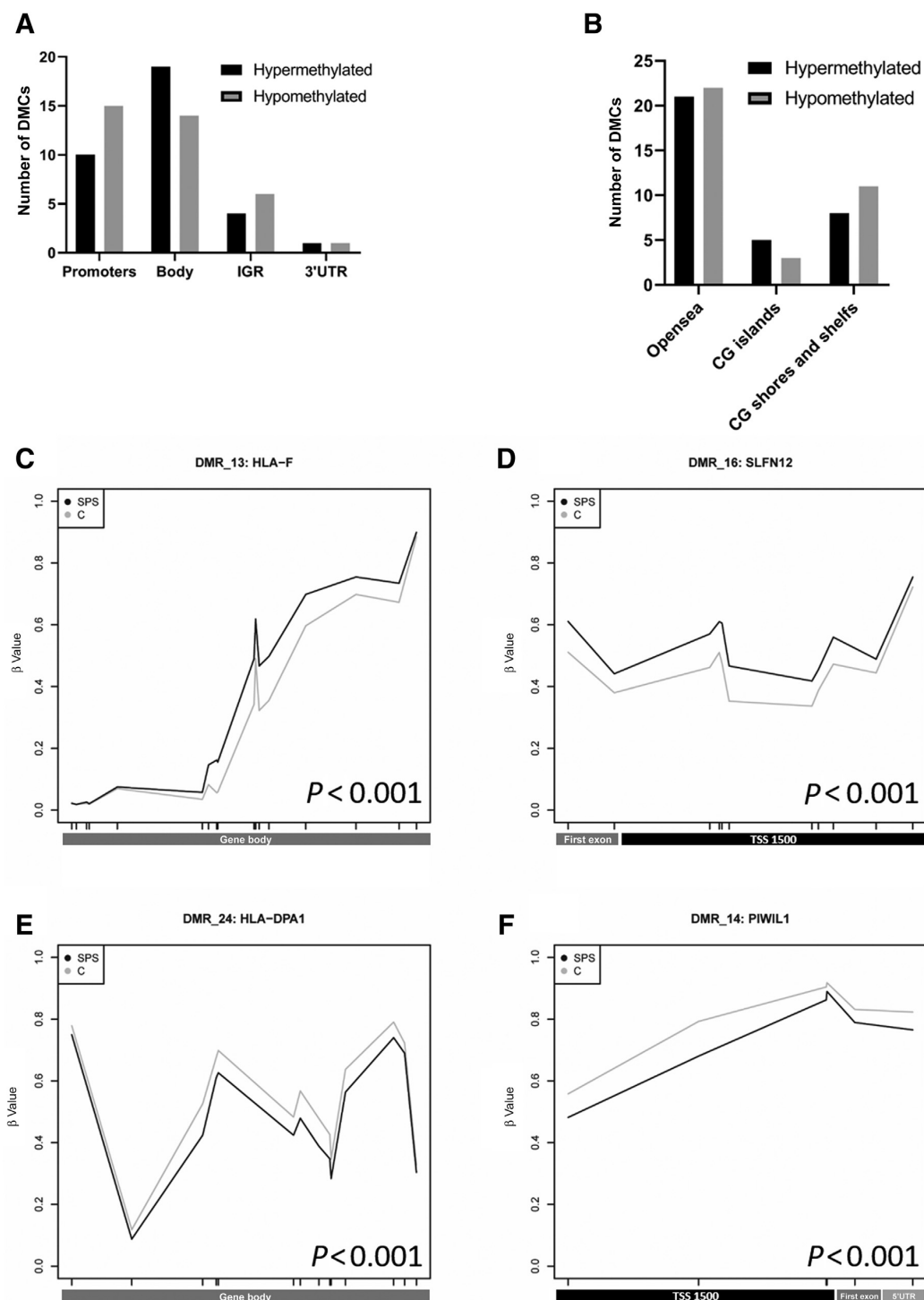


Figure 2 Distribution of differentially hypermethylated (black) and hypomethylated (gray) CpG sites, according to location relative to genes (A) and to CG density (B). Differentially methylated regions of *HLA-F* (C), *SLFN12* (D), *HLA-DPA1* (E), and *PIWIL1* (F). Both lines represent the mean β -values (y axis) across the gene region (x axis). **Black line** indicates patients with serrated polyposis syndrome (SPS); and **gray line**, healthy controls (Cs). Each tic on the x axis represents a specific differentially methylated CpG (DMC) and shows its location relative to the gene region. Bars below the x axis: black indicates transcription start site (TSS) 1500 (ie, promoter region); dark gray, gene body or first exon; and light gray, 5' untranslated region (UTR). IGR, intergenic region.

region is a set of multiple CpGs, usually adjacent to each other, which display a predicted strong functional and regional correlation alongside the genome and possibly form a functional unit for the transcriptional regulation.²⁸ To detect DMRs between two populations on normalized β -values, the Bioconductor package bump hunter was used with default parameters,²⁹ included in the ChAMP. DMR function was assessed, to estimate regions for which a genomic profile deviates from its baseline value.

Differentially methylated cytosines and regions between groups (SPS and healthy) were assessed by linear models,³⁰ including clinical covariates: age, sex, colon location (proximal and distal), and tobacco use after a logit transforming of β -values. Because differences in normal mucosa were predicted to be subtle, a difference in the relative methylation level ($\Delta\beta$ value) of >0.1 (ie, an absolute 10% increase or decrease) was defined as clinically relevant and an adjusted P value (Benjamini-Hochberg method) of <0.05 as statistically significant (adjusted for sex, age, tobacco use, and location). In the case of polyp tissue, a $\Delta\beta$ value of >0.2 (ie, an absolute 20% increase or decrease) was defined as clinically relevant and an adjusted P value of <0.05 as statistically significant.

Gene Expression Analysis

A next-generation, gene-level, expression-profiling tool was used according the manufacturer's protocol, to analyze the expression levels of $>20,000$ genes in a transcriptome-wide manner (Human Clariom S Assay; reference 902927; ThermoFisher Scientific). The raw gene expression was processed using bioconductor tools.³¹ Briefly, the entrez-based probe definition,³² normalization using rma, and differential expressed ranking using moderated t -statistics were used.³⁰ Correlation between genes and differentially methylated regions was computed using Spearman correlation. A fold change of at least ± 1.1 (ie, a 10% increase or decrease in expression level) with a P value of <0.05 was considered as relevant and statistically significant.

Results

Characteristics of the Study Cohorts

Clinical characteristics of the study cohorts are summarized in Table 1. Mean age in the discovery phase was 59 and 62 years for patients with SPS and healthy controls, respectively. Of the 50 SPS cases, four patients had CRC (8%) in the discovery phase. In the validation cohort, mean age was 60 and 62 years for patients with SPS and healthy individuals, respectively. There were seven cases of CRC in the SPS group (41%).

Discovery of Differentially Methylated CpGs in Fresh-Frozen Tissue

The aim was to identify differentially methylated CpGs (DMCs) as potential biomarkers for patients with SPS.

Following the field defect hypothesis, we sought to identify DMCs in normal mucosa between patients with SPS and healthy controls. After adjusting for age, sex, colon location (proximal and distal), and tobacco use, 34 differentially hypermethylated and 36 differentially hypomethylated CpGs were found (Supplemental Table S1). Both events, hypermethylation and hypomethylation, occurred predominantly in promoter regions and gene bodies and not in intergenic regions (Figure 2A). Opensea areas (ie, CpGs unrelated to CpG islands) were almost twice as frequently affected as CpG islands or shores (Figure 2B). Those differentially hypermethylated and hypomethylated CpGs not related to intergenic regions corresponded to 18 and 27 genes, respectively (Supplemental Table S1). For most genes, only one CpG site was affected; however, some showed a differential methylation level at multiple CpG sites. The most hypermethylated CpG regions (ie, with more than one CpG site affected) were *HLA-F*, *SLFN12*, *B2M*, *HLA-DMA*, and *RARRES3*, and the most hypomethylated genes were *PIWIL1* and *ANK3* (Supplemental Table S1).

Because SPS subtypes are phenotypically different, their methylation profiles were next studied separately (Supplemental Figure S1). No significant differences were observed between World Health Organization 2010 subtype I ($N = 15$) and subtype III ($N = 15$) (Supplemental Table S2 and Supplemental Figure S1). When compared with normal mucosa of healthy individuals, subtype III did not show any relevant aberration in its methylation profile (Supplemental Table S3), whereas subtype I showed eight DMCs (all hypomethylated), seven of which corresponded to six genes and one to an intergenic region (Supplemental Table S4).

The methylation profiles were also compared between SPS patients with history of CRC ($N = 4$) and those without CRC ($N = 46$), but no substantial differences were observed. Only four CpGs were statistically significant after adjustment by Benjamini-Hochberg method (cg11699261, cg23979401, cg20106822, and cg12842231). All four CpGs were located in opensea areas and in the gene body of their corresponding gene: *PBLD*, *LOC728723*, *MYOM2*, and *KIAA1671* (Supplemental Table S5).

Discovery of Differentially Methylated Regions in Fresh-Frozen Tissue

Differential methylation of a single CpG site is highly relevant for biomarker discovery. However, because previous studies have found CpGs strongly correlated across the genome in a functional and regional manner, DMRs were studied next.^{28,33} DMRs are genomic regions with multiple adjacent CpG sites that are differentially methylated and possibly form a functional unit involved in transcriptional regulation. Fifty-seven differentially hypermethylated and 155 hypomethylated regions ($P < 0.05$) were retrieved between patients with SPS and healthy individuals (Supplemental Table S6). Four of these DMR-defined genes

Table 2 Differentially Methylated CpGs with Best Discriminatory Performance and Good Correlation with GE

Gene	CHR	CpG	Gene location	CpG location	ME
					Direction
<i>HLA-F</i>	6	cg12588917	Body	Island	Hyper
		cg24351901	Body	Island	Hyper
		cg15331332	Body	Shore	Hyper
		cg23892836	Body	Island	Hyper
		cg07016276	Body	Island	Hyper
		cg00504902	Body	Shore	Hyper
<i>SLFN12</i>	17	cg19566405	TSS1500	Opensea	Hyper
		cg05174890	TSS1500	Opensea	Hyper
		cg11346248	TSS1500	Opensea	Hyper
		cg03251655	First exon	Opensea	Hyper
		cg21697381	TSS1500	Opensea	Hyper
<i>HLA-DMA</i>	6	cg02806715	Body	Opensea	Hyper
		cg24129356	First exon	Opensea	Hyper
<i>UBE2L6</i>	11	cg27429749	Body	Shore	Hyper
<i>ANK3</i>	10	cg14274656	First exon	Opensea	Hypo
		cg16134349	First exon	Opensea	Hypo
<i>BST2</i>	19	cg11558551	TSS200	Opensea	Hyper
<i>HLA-DPA1</i>	6	cg12858166	3'UTR	Opensea	Hyper

(table continues)

CHR, chromosome; GE, gene expression; Hyper, hypermethylation; Hypo, hypomethylation; ME, gene methylation; TSS, transcription start site; UTR, untranslated region.

overlapped with our findings of the single CpG analysis described above: *HLA-F*, *SLFN12*, and *HLA-DPA1* (all three hypermethylated) and *PIWIL1* (hypomethylated) (Figure 2, C–F).

Colorectal Location Impacts Substantially on the Methylation Profile

Differential aberrant methylation has been described in the different parts of the colorectum.³⁴ Therefore, from each patient with SPS and healthy individual a pair of one proximal and one distal biopsy specimen were included. When stratified by location, 339 DMCs were retrieved between SPS and healthy individuals if only the proximal location was analyzed (Supplemental Table S7) and 343 DMCs if only the distal location was analyzed (Supplemental Table S8). Interestingly, an important predominance of hypomethylation events in both locations (325 of 339 proximally and 330 of 343 distally) as well as a predominance of opensea DMCs (209 of 339 proximally and 204 of 343 distally) was found. To evaluate the stability of the methylome, the profile of the healthy individuals was analyzed by age group and no significant correlation was found between age and global methylation status for the proximal or the distal location [$R = -0.12$ ($P = 0.64$) versus $R = 0.38$ ($P = 0.11$), respectively] (Supplemental Figure S2, A and B). Regarding sex, a minimum tendency of higher methylation was found for female patients, but this was only significant for the distal location ($P = 0.021$) (Supplemental Figure S2, C and D).

Correlation with Gene Expression

To validate the functional impact of aberrant methylation observed in normal mucosa, the correlation of the methylation level of the differentially methylated CpGs was further studied with the expression level of their corresponding gene in the same fresh-frozen samples. Fifty genes showed a strong correlation ($r > 0.7$; $P < 0.05$), and 1934 genes showed a moderate correlation ($0.3 < r < 0.7$; $P < 0.05$) (Supplemental Table S9). The corresponding CpGs of seven of the genes with a moderate correlation ($r > 0.3$) showed highly significant differences in their methylation levels ($\Delta\beta > 0.1$; $P < 0.0001$) and significant fold changes in their expression levels (fold change > 1.1 ; $P < 0.05$): *HLA-F*, *SLFN12*, *HLA-DMA*, *UBE2L6*, *ANK3*, *BST2*, and *HLA-DPA1* (Table 2 and Figure 3).

Independent Validation in FFPE Samples of Normal Mucosa of Patients with SPS

To validate the results, FFPE samples of normal-appearing mucosa from the proximal and distal colon of an independent cohort of 17 SPS patients and 10 healthy individuals were analyzed (Supplemental Table S10). When analyzed by gene, two genes could be positively validated: *HLA-F*, which showed a significant hypermethylation in both fresh-frozen and paraffin-embedded specimens; and *KLF11*, which showed a significant hypomethylation in both specimens (Table 3 and Supplemental Tables S1 and S10). Of note, *HLA-F* was one of the genes that showed a moderate correlation between its methylation status and gene

Table 2 (continued)

ME		GE			Correlation of ME-GE	
$\Delta\beta$ Methylation	<i>P</i> value	Direction	Fold change	<i>P</i> value	<i>r</i>	<i>P</i> value
0.145	1.2×10^{-11}	Down	-1.246	0.001	-0.631	0
0.144	2.4×10^{-9}					
0.142	6.7×10^{-9}					
0.129	3.5×10^{-9}					
0.101	4.6×10^{-6}					
0.102	2.2×10^{-6}	Down	-1.223	0.000	-0.583	0
0.130	2.2×10^{-8}					
0.113	7.4×10^{-7}					
0.110	6.8×10^{-8}					
0.100	1.5×10^{-7}					
0.100	7.5×10^{-8}	Down	-1.276	0.000	-0.578	0
0.126	1.0×10^{-11}					
0.121	5.3×10^{-11}					
0.117	2.2×10^{-6}					
-0.117	3.0×10^{-6}					
-0.104	5.0×10^{-8}	Down	-1.140	0.033	-0.409	1.0×10^{-6}
0.102	5.0×10^{-8}					
0.104	1.1×10^{-2}					
		Down	-1.361	0.000	-0.380	6.0×10^{-6}
		Down	-1.198	0.003	-0.315	2.0×10^{-4}

expression levels ($r = -0.631$) in the exploratory phase of the study.

Similar to the analysis in fresh-frozen samples, in FFPE tissue, no statistically significant aberrant methylation profiles were found between patients with CRC ($N = 7$) and those without ($N = 10$). Of 1208 CpGs that showed >10% increase or decrease in their methylation level, none reached statistical significance after adjustment (Supplemental Table S11).

Validation in FFPE Samples of Polyp Tissue

We next hypothesized that the changes detected in normal mucosa (field defect) predispose for the development of serrated polyps and thus should be present in preneoplastic lesions. To confirm this hypothesis, the differential methylation pattern of an independent cohort of 24 serrated lesions (6 HPs and 18 SSLs) were analyzed and compared with 7 healthy controls. Because pathologic tissue was predicted to harbor more epigenetic changes compared with normal mucosa, more stringent parameters were predefined for the detection of differences in methylation levels and 27,062 significantly hypermethylated and 9677 significantly hypomethylated CpG sites were identified. When looking at DMCs in promoter regions, almost 10 times more hypermethylated DMCs (13,999 CpGs) than hypomethylated DMCs (1418 CpGs) were detected. Hypermethylated DMCs not related to intergenic regions corresponded to 4203 genes, and hypomethylated CpGs corresponded to

3044 genes (Supplemental Table S12). Furthermore, nine shared genes that harbored DMCs in both cohorts were identified, of which three were hypermethylated (*HLA-F*, *CDC42SE2*, and *RBMS1*) and six were differentially hypomethylated (*MUC21*, *ANK3*, *SNX29*, *TRERF1*, *KLF12*, and *AGPAT4*).

In summary, *HLA-F* was found to be differentially hypermethylated in fresh-frozen samples of normal mucosa of SPS patients, correlating well with gene expression, and differentially hypermethylated in FFPE samples of an independent cohort as well as in FFPE samples of serrated lesions (Figure 4).

Gene Set Enrichment Analysis

To better understand the possible functional implications of the genes related to the DMCs found herein, a gene set enrichment analysis was performed on the list of DMCs found in the fresh-frozen samples. By using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes software v92.0 (<https://www.genome.jp/kegg>), a significant enrichment was identified in 24 different gene sets with an adjusted *P* value of <0.05 (Supplemental Table S13). Overall, there was an enrichment in gene sets related to DNA methylation, cancer (also colon cancer), morphogenesis (homeobox genes), embryonic stem cell identity, cell-cell adhesion, and immune response, particularly IgA production and antigen processing and presentation. Intriguingly, none of the typical genes linked to the CIMP was enriched in our data set.

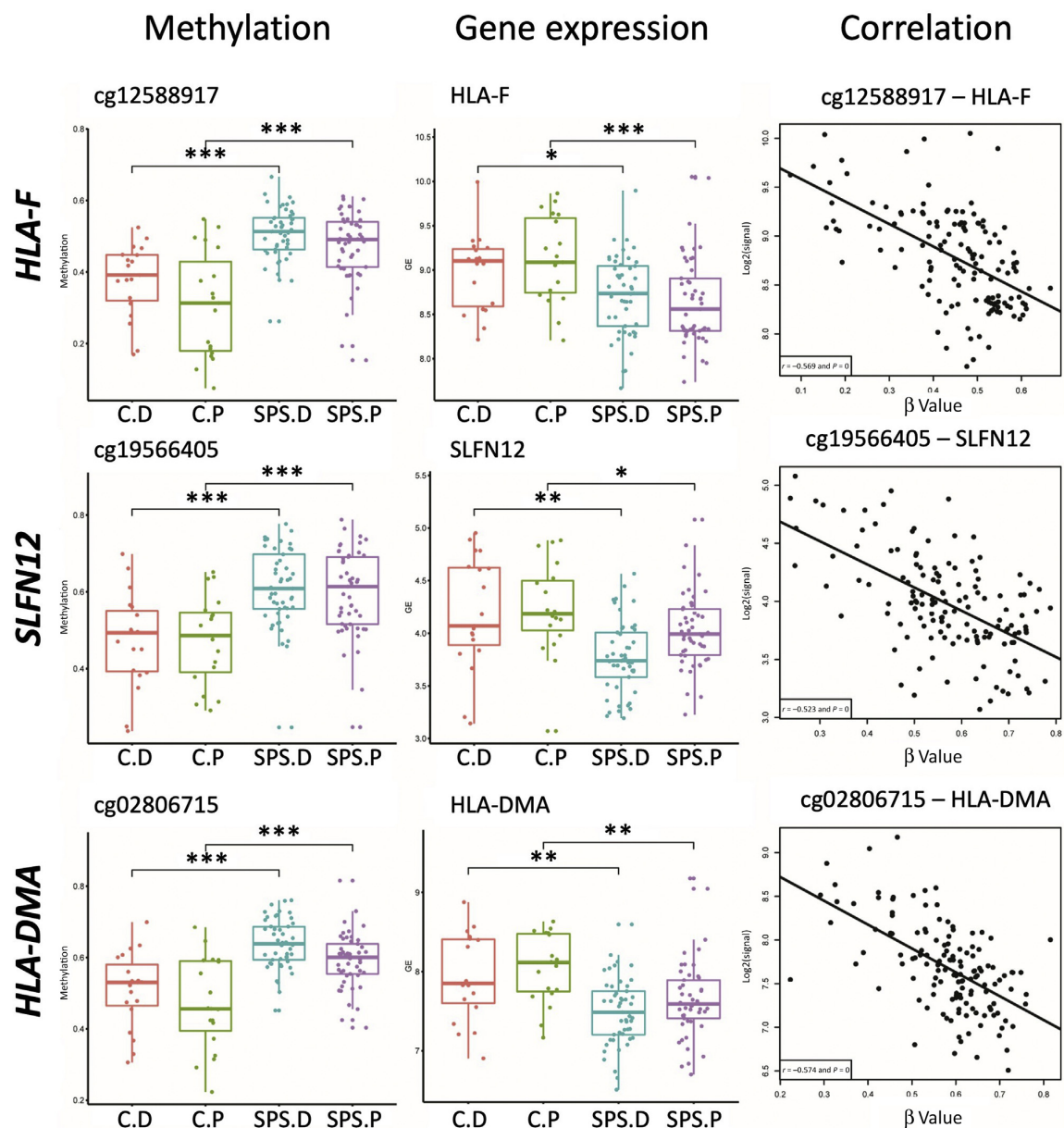


Figure 3 For the three genes (rows) with best differences in methylation levels (left panels) and expression levels (middle panels) as well as good correlation between expression and methylation (right panels), box-and-whisker plots and correlation curves are displayed: *HLA-F*, *SLFN12*, and *HLA-DMA*. For differences in methylation levels, one representative CpG site is shown. For both methylation and gene expression levels, differences are disclosed by group and location: distal colon of healthy control (C.D), proximal colon of healthy control (C.P), distal colon of serrated polyposis syndrome (SPS; SPS.D), and proximal colon of SPS (SPS.P). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. HLA, human leukocyte antigen.

Discussion

The pathogenesis of SPS remains elusive. In this study, for the first time, the methylation profile of >850,000 CpGs was analyzed in normal mucosa of patients with SPS to explore the field defect of cancerization in this disease. The

results support the existence of a methylation field defect in normal mucosa between patients with SPS and healthy individuals. The fact that the differential methylation levels of some DMCs inversely correlated with the expression levels of their corresponding gene suggests that these phenomena have a functional impact and thus underlines

Table 3 Validated Differentially Methylated and Expressed Genes in FFPE

Gene	CHR	CpG	Methylation	$\Delta\beta$	<i>P</i> value	Gene location	CpG location
<i>HLA-F</i>	6	cg22298860	Hyper	0.145	2.0×10^{-7}	TSS1500	Shore
		cg26751972	Hyper	0.143	4.6×10^{-6}	Body	Island
		cg11768167	Hyper	0.101	1.1×10^{-5}	TSS1500	Shore
		cg11587584	Hyper	0.101	1.6×10^{-4}	Body	Shore
<i>KLF11</i>	2	cg05647197	Hypo	-0.156	2.0×10^{-5}	TSS1500	Shore
		cg18424122	Hypo	-0.148	9.2×10^{-5}	TSS1500	Shore
		cg01354088	Hypo	-0.123	2.5×10^{-4}	TSS1500	Island
		cg12005760	Hypo	-0.113	1.1×10^{-4}	TSS1500	Island
		cg15123428	Hypo	-0.110	3.2×10^{-4}	Body	Shore
		cg11249298	Hypo	-0.107	1.8×10^{-8}	Body	Shore

CHR, chromosome; FFPE, formalin fixed, paraffin embedded; Hyper, hypermethylation; Hypo, hypomethylation; TSS, transcription start site.

their relevance. Finally, the hypermethylation of the gene body of *HLA-F* in formalin-fixed tissue was validated in an independent cohort and in serrated polyp tissue, highlighting it as a promising biomarker candidate for the field defect in SPS.

In a former study by Minoo et al,¹² DNA hypermethylation of a limited panel of the so-called CIMP markers was found to be more extensive in serrated polyps from patients with SPS compared with patients without criteria for SPS, although the number of patients ($N = 3$ in the SPS group, and $N = 9$ in non-SPS group) was limited. In the same study, this difference was even more apparent in normal mucosa of the proximal colon. Our results are in line with that preliminary observation using a high-throughput analysis of methylation. However, notably, no significant differences were found in any of the previously described CIMP markers in normal colonic mucosa. Instead, in serrated polyp tissue, intense promoter hypermethylation was found in most of the previously described CIMP markers (ie, *NEUROG1*, *RUNX3*, *CACNA1G*, *MLH1*, *CDKN2A*, *RASSF2*, and *MGMT*), suggesting that they may not be present at early disease stages but rather in developed

serrated polyps.^{35,36} Another interesting finding of our results is that, apart from CpG islands in promoters, aberrant CpGs in open sea areas and CpGs located in gene bodies represent a meaningful proportion of the differential methylation observed in normal mucosa. Nonetheless, the technology used in our study still captures only 3% to 4% of around 28 million CpG sites in the human DNA, and higher yields are expected with the advent of even more advanced technologies in the near future.

In this study, we tested the hypothesis that the methylation field defect in normal mucosa could potentially be used to identify patients with SPS at higher risk for CRC. However, no significant differences were detected in the aberrant methylation between patients with and without CRC in none of the two independent cohorts analyzed. Because the absolute numbers of cases with CRC were rather low in both cohorts (4 of 50 and 7 of 17, respectively) and because of the underlying heterogeneity of the disease, increasing the number of CRC cases may lead to significant results in larger cohorts. However, it is also possible that those alterations necessary for polyp formation and cancer progression are only measurable in the developed lesions

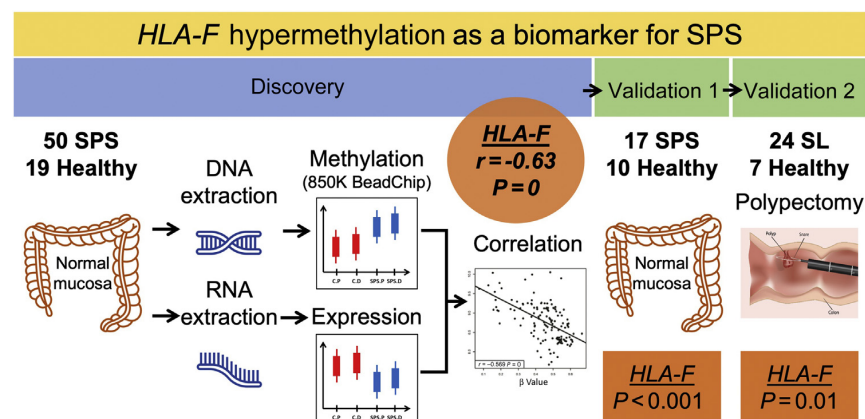


Figure 4 Summary of the design of the study and highlighting hypermethylation of *HLA-F* as the most promising biomarker candidate for serrated polyposis syndrome (SPS). SL, serrated lesions. Icons/images are licensed from thenounproject.com or iStock by Getty Images.

and not in the normal mucosa. This would explain the observation that a substantially higher number of DMCs were found in direct polyp tissue compared with normal-appearing mucosa.

Hypermethylation of the gene body of *HLA-F* has emerged as the most consistent biomarker candidate for SPS because it showed the highest number of DMCs, it was validated in an independent cohort of patients, and it was validated in serrated polyp tissues. In addition, *HLA-F* was significantly underexpressed in the normal mucosa, with an inverse correlation with the methylation status. In the literature, the function of *HLA-F* is still not fully elucidated, but it is clear that it participates in human peptide presentation to natural killer cell receptors and regulates immune response.³⁷ Furthermore, the expression of *HLA-F* and other human leukocyte antigen (HLA) molecules has been linked to several cancers of the digestive system in the literature,^{38–41} but the association of its methylation status with a precancerous condition like SPS is truly a novel finding of our study. García-Solano et al,⁴² in a study comparing the methylation profile of serrated adenocarcinomas and tumors with sporadic microsatellite instability, found that hypermethylation of *HLA-DOA* was associated with tumors with sporadic microsatellite instability, with an inverse correlation in the expression levels. Interestingly, *HLA-DOA* was also found to be differentially methylated in serrated polyp tissues (Supplemental Table S12) but not in the normal mucosa of patients with SPS, indicating that it may be a later event in polyp formation. Besides from *HLA-F*, other HLA molecules were found to be differentially methylated, such as *HLA-DMA* and *HLA-DPA1* when looking at single DMCs as well as *HLA-E*, *HLA-J*, and *HLA-DPA1* when looking at DMRs (Supplemental Table S6). In some cases, their higher methylation status correlated with lower expression levels. HLA class I molecules seem to play an important role for immune surveillance of cancer cells, and our study generates the hypothesis of their involvement in cancer initiation and progression in SPS.⁴³

There are some limitations in this study. First, the results were not technically validated with a different technique, such as pyrosequencing.⁴² However, a clinical validation was performed in an independent cohort of patients using the same method, which has been extensively demonstrated to be robust. Second, even though so far we have analyzed the largest cohort of patients with SPS for their methylation profile in normal mucosa, the number of cases was not large enough to perform an adequate subgroup analysis comparing the World Health Organization I and II criteria, or patients with and without CRC. Third, with the comparative and cross-sectional design, it is impossible to perform causal inference between methylation status and expression levels, and the significance of the identified genes and SPS carcinogenesis. There is abundant evidence for the relation between gene promoter hypermethylation and down-regulation of gene expression.⁴⁴ However, many

other processes influence gene expression, such as histone modifications, miRNAs, and long noncoding RNAs, which all interplay in a complex regulatory network.^{45–47} Moreover, the effects of hypermethylation or hypomethylation of intergenic regions on gene expression are more elusive, and it is likely that most of the epigenetic alterations observed are passenger events rather than causative ones.⁴⁸ Finally, this study constitutes a proof-of-concept study that supports the existence of a certain methylation field defect in SPS that needs to be validated in further investigations.

In conclusion, in this study, we describe the existence of aberrant methylation in the normal mucosa of patients with SPS, associated with changes in the expression of the affected genes. From a clinical perspective, it would be desirable not only to properly diagnose this disease, but also to detect those patients at higher risk of developing colorectal cancer to improve surveillance programs and reduce the burden of colonoscopies. Prospective studies with serial sampling of normal mucosa, serrated polyp tissue, and serrated adenocarcinoma can provide deeper pathophysiological insights and facilitate the discovery of biomarkers for cancer risk.

Conclusions

- Epigenome-wide DNA methylation analysis (by 850K InfiniumEpic BeadChip Kit) is capable of identifying numerous DMCs and DMRs in fresh-frozen samples of normal mucosa of patients with SPS.
- Two genes with DMCs have been validated in FFPE samples of an independent cohort of SPS patients: *HLA-F* and *KLF11*.
- Seven genes showed significant changes in their expression levels, and these correlated well with the methylation status of their corresponding CpGs.
- Some validated DMCs are also present in polyp tissue alongside additional epigenetic changes: *HLA-F*, *CDC42SE2*, *RBMS1*, *MUC21*, *PRR12*, *ANK3*, *SNX29*, *TRERF1*, *KLF12*, and *AGPAT4*.
- There is an enrichment in methylation changes in genes involved in cancer pathways and immune response, but their possible role in the colorectal carcinogenesis needs to be elucidated.

Author Contributions

G.J., E.H.-I., and F.B. conceptualized the study; E.H.-I., J.M., and F.B. developed the methodology; J.J.L. and J.S. were responsible for software development and coding; G.J. and J.J.L. validated the data; G.J., E.H.-I., J.J.L., J.S., and E.B. formally analyzed and synthesized the study data; E.H.-I., G.J., J.M., Y.O., E.Q., S.C., L.M., M.D., T.O., A.S., L.R., O.O., and J.L. were involved in the investigation process, performed the experiments, and/or collected the data; Y.O., E.Q., G.H., M.C., A.G., E.B., R.J., A.C., and

F.B. provided resources for the study including patient samples, instrumentation, and reagents; G.J., J.J.L., J.S., and S.C. were responsible for data curation; G.J. wrote and prepared the original draft; all authors were involved in writing and reviewing the final manuscript; E.H.-I. and G.J. visualized the results and presented them at national and international conferences; A.C., A.G., M.P., and F.B. supervised the research; E.H.-I., G.J., and F.B. were the administrators of the research project; F.B., A.G., and G.J. acquired funding.

Acknowledgment

We thank the patients for their participation.

Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.03.010>.

References

1. Rosty C, Brosens LAA, Dekker E, Nagtegaal ID: Serrated Polyposis. ed 5. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2019
2. Ijspeert JEG, Bevan R, Senore C, Kaminski MF, Kuipers EJ, Mroz A, Bessa X, Cassoni P, Hassan C, Repici A, Balaguer F, Rees CJ, Dekker E: Detection rate of serrated polyps and serrated polyposis syndrome in colorectal cancer screening cohorts: a European overview. *Gut* 2017, 66:1225–1232
3. Rivero-Sanchez L, Lopez-Ceron M, Carballal S, Moreira L, Bessa X, Serradesanferm A, Pozo A, Augé JM, Ocaña T, Sánchez A, Leoz ML, Cuatrecasas M, Grau J, Llach J, Castells A, Balaguer F, Pellisé M: Reassessment colonoscopy to diagnose serrated polyposis syndrome in a colorectal cancer screening population. *Endoscopy* 2017, 49:44–53
4. Boparai KS, Mathus-Vliegen EMH, Koornstra JJ, Nagengast FM, van Leerdam M, van Noesel CJM, Houben M, Cats A, van Hest LP, Fockens P, Dekker E: Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: a multicentre cohort study. *Gut* 2010, 59:1094–1100
5. Bleijenberg AGGC, Ijspeert JEEG, van Herwaarden YJ, Carballal S, Pellisé M, Jung G, Bisseling TM, Nagtegaal ID, Van Leerdam ME, van Lelyveld N, Bessa X, Rodríguez-Moranta F, Bastiaansen B, de Klaver W, Rivero L, Spaander MCWC, Koornstra JJ, Bujanda L, Balaguer F, Dekker E: Personalised surveillance for serrated polyposis syndrome: results from a prospective 5-year international cohort study. *Gut* 2020, 69:112–121
6. Bleijenberg AGC, Ijspeert JEG, Hazewinkel Y, Boparai KS, Oppeneer SC, Bastiaansen BAJ, Dekker E: The long-term outcomes and natural disease course of serrated polyposis syndrome: over 10 years of prospective follow-up in a specialized center. *Gastrointest Endosc* 2020, 92:1098–1107.e1
7. García-Solano J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuela-Fuentes P, Mäkinen MJ: Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2010, 41:1359–1368
8. García-Solano J, García-Solano ME, Torres-Moreno D, Carbonell P, Trujillo-Santos J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P: Biomarkers for the identification of precursor polyps of colorectal serrated adenocarcinomas. *Cell Oncol* 2016, 39:243–252
9. De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F: The molecular hallmarks of the serrated pathway in colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2019, 11:1017
10. Tateyama H, Li W, Takahashi E, Miura Y, Sugiura H, Eimoto T: Apoptosis index and apoptosis-related antigen expression in serrated adenoma of the colorectum. *Am J Surg Pathol* 2002, 26:249–256
11. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amoroso M, Farraye FA: Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 2006, 30:1491–1501
12. Minoo P, Baker K, Goswami R, Chong G, Foulkes WD, Ruszkiewicz AR, Barker M, Buchanan D, Young J, Jass JR: Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis. *Gut* 2006, 55:1467–1474
13. Parker HR, Orjuela S, Martinho Oliveira A, Cereatti F, Sauter M, Heinrich H, Tanzi G, Weber A, Komminoth P, Vavricka S, Albanese L, Buffoli F, Robinson MD, Marra G: The proto CpG island methylator phenotype of sessile serrated adenomas/polyps. *Epigenetics* 2018, 13:1088–1105
14. Weisenberger DJ, Levine AJ, Long TI, Buchanan DD, Walters R, Clendenning M, Rosty C, Joshi AD, Stern MC, Le Marchand L, Lindor NM, Daftary D, Gallinger S, Selander T, Bapat B, Newcomb PA, Campbell PT, Casey G, Ahnen DJ, Baron JA, Haile RW, Hopper JL, Young JP, Laird PW, Siegmund KD: Colon Cancer Family Registry: Association of the colorectal CpG island methylator phenotype with molecular features, risk factors, and family history. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015, 24:512–519
15. Rad R, Cadiñanos J, Rad L, Varela I, Strong A, Kriegl L, Constantino-Casas F, Eser S, Hieber M, Seidler B, Price S, Fraga MF, Calvanese V, Hoffman G, Ponstingl H, Schneider G, Yusa K, Grove C, Schmid RM, Wang W, Vassiliou G, Kirchner T, McDermott U, Liu P, Saur D, Bradley A: A genetic progression model of Braf V600E-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell* 2013, 24:15–29
16. Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, Cullings HM, Takeda M, Kimura K, Kambara T, MacPhee DG, Young J, Leggett BA, Jass JR, Tanaka N, Matsubara N: Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol* 2004, 22:4584–4594
17. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Dvorak K, Garewal H: Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. *Cancer Lett* 2008, 260:1–10
18. Luo Y, Yu M, Grady WM: Field cancerization in the colon: a role for aberrant DNA methylation? *Gastroenterol Rep* 2014, 2:16–20
19. Belshaw NJ, Elliott GO, Foxall RJ, Dainty JR, Pal N, Coupe A, Garg D, Bradburn DM, Mathers JC, Johnson IT: Profiling CpG island field methylation in both morphologically normal and neoplastic human colonic mucosa. *Br J Cancer* 2008, 99:136–142
20. Worthley DL, Whitehall VLJ, Buttenshaw RL, Irahara N, Greco SA, Ramsnes I, Mallitt KA, Le Leu RK, Winter J, Hu Y, Ogino S, Young GP, Leggett BA: DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene* 2010, 29:1653–1662
21. Ogino S, Nishio K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, Giovannucci EL, Fuchs CS: CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009, 58:90–96
22. Castells A, Quintero E: Programmatic screening for colorectal cancer: the COLONPREV study. *Dig Dis Sci* 2015, 60:672–680

23. van Leerdam ME, Roos VH, van Hooft JE, Dekker E, Jover R, Kaminski MF, Latchford A, Neumann H, Pellisé M, Saurin J-C, Tanis PJ, Wagner A, Balaguer F, Ricciardiello L: Endoscopic management of polyposis syndromes: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) guideline. *Endoscopy* 2019, 51:877–895
24. De Ruijter TC, De Hoon JP, Slaats J, De Vries B, Janssen MJ, Van Wezel T, Aarts MJ, Van Engeland M, Tjan-Heijnen VC, Van Neste L, Veeck J: Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue epigenomics using Infinium HumanMethylation450 BeadChip assays. *Lab Invest* 2015, 95:833–842
25. Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, Bartlett T, Tegner J, Gomez-Cabrero D, Beck S: A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics* 2013, 29:189–196
26. Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, Beck S: ChAMP: 450k Chip analysis methylation pipeline. *Bioinformatics* 2014, 30:428–430
27. Tian Y, Morris TJ, Webster AP, Yang Z, Beck S, Feber A, Teschendorff AE: ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips. *Bioinformatics* 2017, 33:3982–3984
28. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S, Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S: Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet* 2011, 12:529–541
29. Jaffe AE, Murakami P, Lee H, Leek JT, Fallin MD, Feinberg AP, Irizarry RA: Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *Int J Epidemiol* 2012, 41: 200–209
30. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK: Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015, 43:e47
31. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH, Zhang J: Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004, 5:R80
32. Dai M, Wang P, Boyd AD, Kostov G, Athey B, Jones EG, Bunney WE, Myers RM, Speed TP, Akil H, Watson SJ, Meng F: Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res* 2005, 33:e175
33. Vanderkraats ND, Hiken JF, Decker KF, Edwards JR: Discovering high-resolution patterns of differential DNA methylation that correlate with gene expression changes. *Nucleic Acids Res* 2013, 41: 6816–6827
34. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R, Liao X, Waldron L, Hoshida Y, Huttenhower C, Chan AT, Giovannucci E, Fuchs C, Ogino S: Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut* 2012, 61:847–854
35. Rhee Y-Y, Kim K-J, Kang GH: CpG island methylator phenotype-high colorectal cancers and their prognostic implications and relationships with the serrated neoplasia pathway. *Gut Liver* 2017, 11: 38–46
36. Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H: Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics* 2016, 8:1–14
37. Dulberger CL, McMurtrey CP, Hölzemer A, Neu KE, Liu V, Steinbach AM, Garcia-Beltran WF, Sulak M, Jabri B, Lynch VJ, Altfeld M, Hildebrand WH, Adams EJ: Human leukocyte antigen F presents peptides and regulates immunity through interactions with NK cell receptors. *Immunity* 2017, 46:1018–1029.e7
38. Wu B, Yang H, Ying S, Lu H, Wang W, Lv J, Xiong H, Hu W: High HLA-F expression is a poor prognosis factor in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2018, 2018: 7691704
39. Ishigami S, Arigami T, Okumura H, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, Maemura K, Kijima Y, Ishihara Y, Sasaki K, Uenosono Y, Natsugoe S: Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-F expression in gastric cancer. *Anticancer Res* 2015, 35: 2279–2285
40. Xu Y, Han H, Zhang F, Lv S, Li Z, Fang Z: Lesion human leukocyte antigen-F expression is associated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2015, 9:300–304
41. Zhang X, Lin A, Zhang JG, Bao WG, Xu DP, Ruan YY, Yan WH: Alteration of HLA-F and HLA i antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2013, 132:82–89
42. García-Solano J, Turpin MC, Torres-Moreno D, Huertas-López F, Tuomisto A, Mäkinen MJ, Conesa A, Conesa-Zamora P: Two histologically colorectal carcinomas subsets from the serrated pathway show different methylome signatures and diagnostic biomarkers. *Clin Epigenetics* 2018, 10:141
43. Kochan G, Escors D, Breckpot K, Guerrero-Setas D: Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology* 2013, 2:e26491
44. Khamas A, Ishikawa T, Mogushi K, Iida S, Ishiguro M, Tanaka H, Uetake H, Sugihara K: Genome-wide screening for methylation-silenced genes in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2012, 41:490–496
45. Cedar H, Bergman Y: Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009, 10: 295–304
46. Poddar S, Kesharwani D, Datta M: Interplay between the miRNome and the epigenetic machinery: implications in health and disease. *J Cell Physiol* 2017, 232:2938–2945
47. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A: Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020, 17:111–130
48. Kalari S, Pfeifer GP: Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis. *Adv Genet* 2010, 70: 277–308

3.3. Resultados del Tercer Proyecto

Organoides de Cáncer Colorrectal Cultivados con Interfaz Aire-Líquido para Evaluar la Respuesta a Terapias Dirigidas al Microambiente Tumoral

3.3.1. Generación de Metástasis Hepáticas de Cáncer Colorrectal

El objetivo general del tercer proyecto de la tesis ha sido probar si dos tipos de cultivos con interfaz aire-líquido eran capaces de mantener el microambiente tumoral y predecir la respuesta a tratamientos dirigidos al microambiente tumoral (MAT). A día de hoy, la inmunoterapia en el CCR está indicada en pacientes con enfermedad metastásica, por lo que en esta tesis se ha utilizado un modelo preclínico de metástasis hepáticas generadas a partir de la inyección intraesplénica de organoides de CCR murinos. Los organoides usados en esta tesis, MTO129 y MTO204, se obtuvieron a partir de metástasis originadas por CCR en ratones con mutaciones en los genes *Apc*, *Kras*, *Trp53* y *Tgfbr2*, y mostraron capacidad invasora y metastásica (ver 'Material y Métodos'). En esta tesis se denominan organoides de 'primera generación' (MTO 1.0, por sus siglas en inglés Mouse Tumor Organoid) porque solo están compuestos por células tumorales epiteliales mientras que los organoides generados a partir de las metástasis hepáticas y cultivados con interfaz aire-líquido se consideran de 'segunda generación' (MTO 2.0 o ALIO, por sus siglas en inglés Air-Liquid Interface Organoids), puesto que contienen componentes del MAT. Incluidos en una matriz de extracto de membrana basal (BME, del inglés Basement Membrane Extract), los MTO 1.0 mostraron un rápido crecimiento bajo el efecto de un suplemento mínimo de factores de crecimiento en el medio de cultivo: el factor de crecimiento epidérmico [EGF] y Noggin – un antagonista de los ligandos de la proteína morfogénica ósea (BMP) para prevenir su diferenciación espontánea (fig. 20a) (350). Partiendo de células individuales, hasta el tercer día se formaron MTOs de entre 50 y 100 μm . Los organoides derivados de CCR mostraron una arquitectura más densa en su interior con una pared más gruesa en comparación a los organoides derivados de mucosa colónica normal cuya estructura era más quística con una pared más fina (fig. 20b). La expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) y de la enzima luciferasa (bioluminiscencia) permitieron monitorizar el crecimiento y la viabilidad de los MTO 1.0 *in vivo* e *in vitro* (fig. 20c y 21b, c). Para generar metástasis, se disgregaron los MTO 1.0 al tercer día de cultivo y se inyectaron de forma intraesplénica en ratones singénicos de la cepa C57BL/6j generando el crecimiento de metástasis hepáticas en unos pocos días (fig. 21a – f). Analizando la progresión en el tiempo, se observó que las metástasis en fases iniciales, compuestas por unas pocas células, no estaban infiltradas por linfocitos, mientras que en fases intermedias presentaban una densa infiltración linfocítica, la cual se perdió en fases tardías cuando se había dado el fenómeno de inmunoexclusión del centro de las metástasis (fig. 22) (302). Por lo tanto, para el presente proyecto, era evidente que el momento adecuado para la administración de la inmunoterapia debía ser en una fase intermedia, anterior a la completa inmunoexclusión de las metástasis. No obstante, al mismo tiempo las metástasis debían tener un tamaño suficiente que

permitiera la microdissección previa a la generación de los ALIOs. Para conseguir el equilibrio entre ambos objetivos, se ensayaron diferentes condiciones de inyección de organoides y diferentes tiempos de sacrificio del animal con los siguientes resultados: primero, un número elevado de células (dos millones) con un tiempo corto de incubación (sacrificio al día siete), generaba un gran número de metástasis siendo demasiado pequeñas para su microdissección. Segundo, la inyección de un número bajo de células (300.000) alargaba demasiado el tiempo de crecimiento (más de cuatro semanas) siendo poco práctico. Se concluyó que el número óptimo de células por inyectar era 500.000, ya que generaban metástasis microdisseccionables en un tiempo razonable (menos de tres semanas) (fig. 21d, f). Tercero, en cuanto a la inyección de células individuales (es decir con organoides completamente disgregados), comparado con la inyección de organoides intactos, se observó que las metástasis generadas a partir de organoides fragmentados tenían un tamaño óptimo para su microdissección. Los cortes de histología con tinciones de hematoxilina y eosina e inmunofluorescencia del Epcam, CD3 y Ki67 confirmaron la presencia de células de adenocarcinoma con diferentes grados de proliferación y de infiltración por linfocitos (fig. 22). Se observó que cuanto más tarde se sacrificaban los animales, la inmunoexclusión de las metástasis era mayor, de tal forma que alrededor del día 16-18 prácticamente no se identificaban linfocitos intratumorales. Dado que la inmunoterapia sólo podía ser eficaz en presencia de estas células, se concluyó que el momento óptimo para el sacrificio de los animales era entre los días 14 y 16.

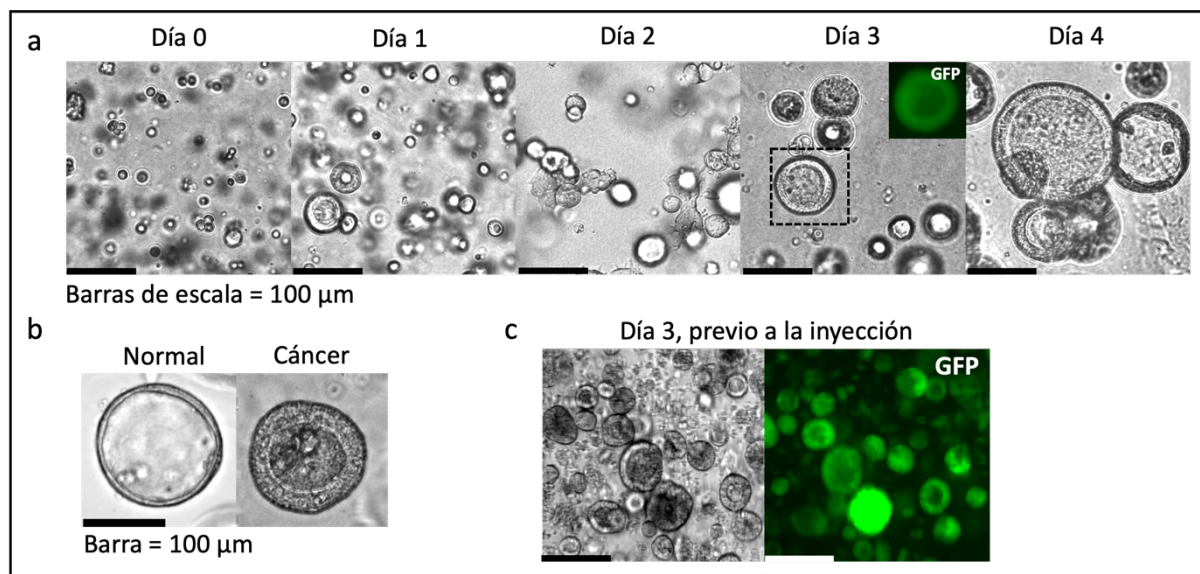


Figura 20 | Crecimiento de MTOs (Mouse Tumor Organoids)

a-c, Organoides de CCR derivados de ratones ('MTOs') portadores de cuatro mutaciones *driver* ($Apc^{fl/fl}$, $Kras^{LSL-G12D}$, $Tgfbr2^{fl/fl}$, $Trp53^{fl/fl}$) y que expresan los reporteros GFP, tomato y luciferasa, han sido cultivados en gotas de extracto de membrana basal (BME). **a,** Formación de organoides desde células individuales y crecimiento durante 4 días. Barras de escala, 100 µm. **b,** Comparación de un organoide de mucosa colónica normal (pared fina y más quístico) con un organoide de cáncer colorrectal (pared gruesa y más denso). **c,** Tamaño de los organoides el día de su inyección intraesplénica tras disolución del BME con solución salina 'HBSS' fría. Barras de escala, 100 µm.

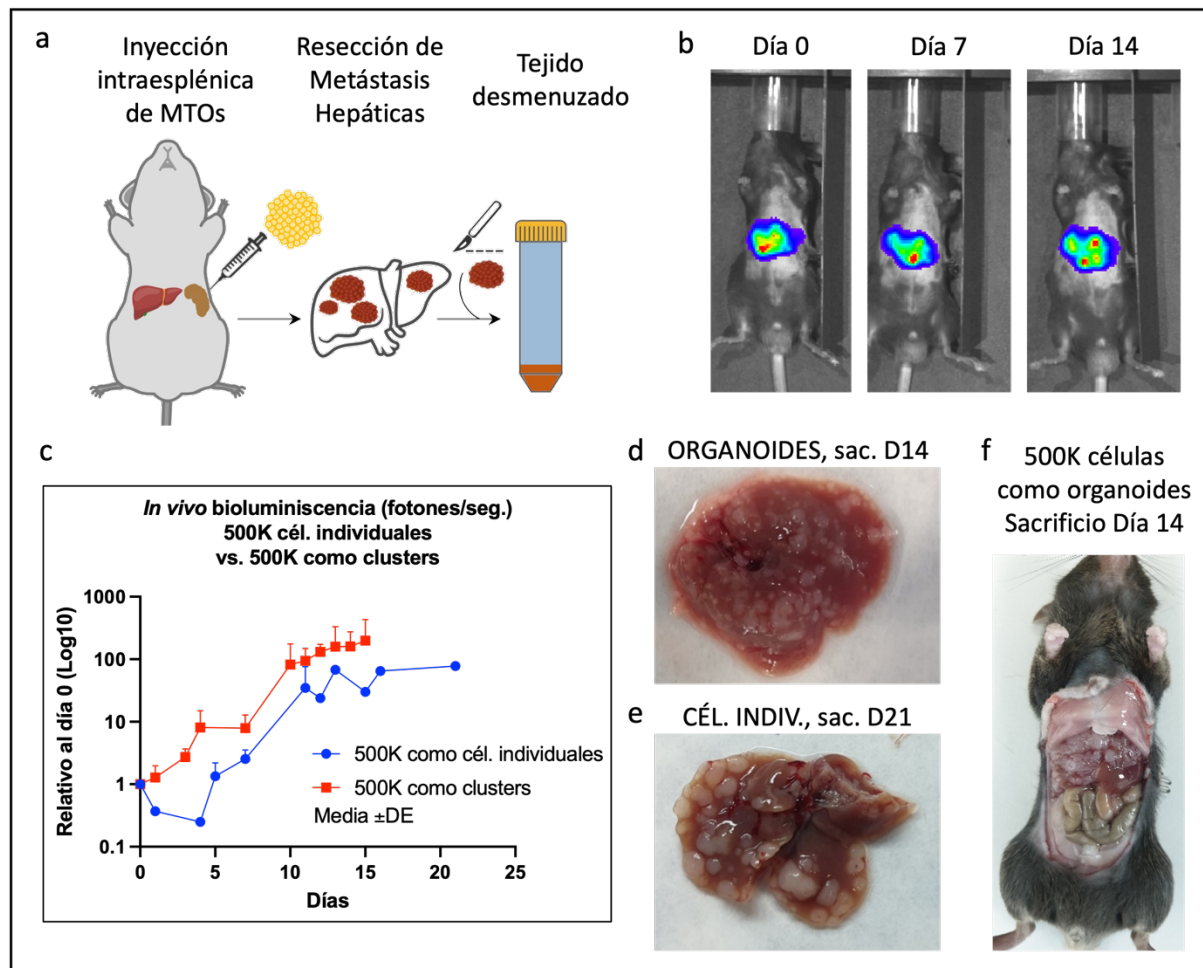


Figura 21 | Generación de metástasis hepáticas

a, Esquema de generación de metástasis hepáticas a partir de la inyección de MTOs. **b**, Imagen de bioluminiscencia *in vivo* al día 0, 7 y 14 tras inyección de 500.000 células de MTOs (en forma de organoides fragmentados o “clusters”). **c**, Bioluminiscencia en fotones por segundo, relativa al día 0, tras inyección de 500.000 células en forma de células individuales vs. clusters. Los clusters presentan un crecimiento más rápido (escala log10). **d+f**, características macroscópicas de las metástasis tras inyección de organoides fragmentados (clusters) (sacrificio al día 14) y **e**, de células individuales (sacrificio al día 21).

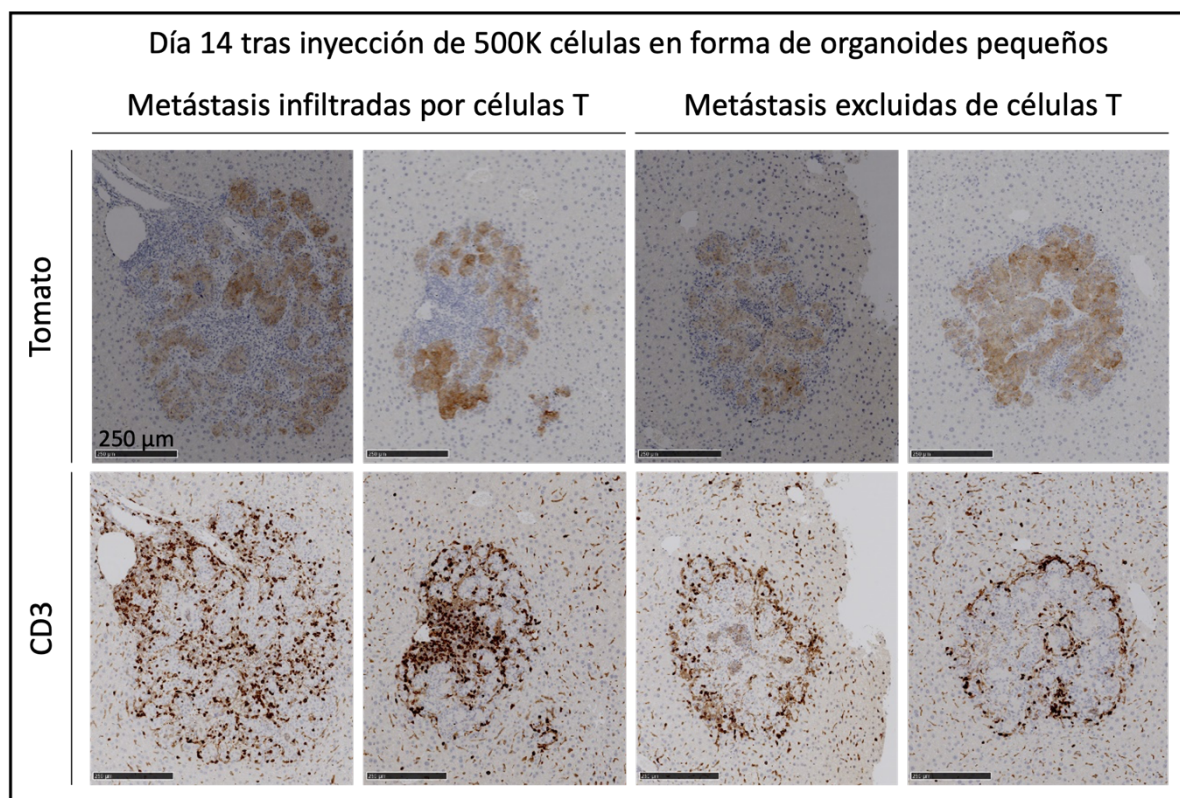


Figura 22 | Infiltración linfocítica de las metástasis hepáticas al día 14

Características microscópicas de las metástasis hepáticas a los 14 días tras inyección de 500.000 células en forma de *clusters*. **Panel arriba**, inmunohistoquímica (IHQ) para tomato (reportero de las células tumorales). **Panel abajo**, IHQ para CD3 (marcador de células T). Al día 14, algunas metástasis aún están densamente infiltradas por células T (los dos ejemplos a la izquierda) mientras que otras ya están excluidas (los dos ejemplos a la derecha). Barras de escala, 250 μ m.

3.3.2. Generación de los Organoides de Segunda Generación (ALIO)

Tras sacrificar los ratones entre los días 14 y 16 y extraer las metástasis hepáticas mediante microdissección, se generaron los cultivos con interfaz aire-líquido para establecer los ALIOs (fig. 23a). Para este tipo de cultivo, se utilizaron placas multipocillo combinadas con insertos de cultivo celular con una membrana de poliéster (PET) transparente en su base con poros de 0,4 μ m, que permite la difusión del medio (fig. 23b, ver también el capítulo de 'Material y Métodos'). Para evaluar el impacto sobre la viabilidad tisular se repitió esta técnica utilizando diferentes condiciones experimentales incluyendo distintos tipos y combinaciones de matriz extracelular y distintos medios de cultivo con combinaciones diferentes de factores de crecimiento. También se valoró sumergir el tejido completamente en medio (sin crear una interfaz aire-líquido), así como el cultivo de metástasis íntegras (sin paso previo de disgregar mecánicamente el tejido), para evaluar si estos factores podían influir en la viabilidad de los cultivos. La viabilidad celular se cuantificó mediante ensayos de luciferina, histología con

inmunofluorescencia y citometría de flujo, y se obtuvieron los siguientes resultados: primero, era necesario cortar las metástasis originales en fragmentos muy pequeños, presumiblemente para facilitar la difusión de oxígeno y nutrientes en un tejido que ya no está conectado al torrente sanguíneo. Segundo, la evaluación mediante bioluminiscencia sugirió que la interfaz aire-líquido era ventajosa comparada con sumergir completamente los organoides en medio de cultivo (fig. 24d), lo que se tradujo en una mejor calidad de la histología de las muestras. Tercero, los fibroblastos y las células inmunes del MAT sobrevivieron mejor cuando se cultivaban en colágeno en lugar de en BME. Las células tumorales, que se suelen cultivar en BME y están adaptados a esta matriz, mostraban una supervivencia y un crecimiento sostenidos también en colágeno en presencia de medio condicionado conteniendo el factor WNT (fig. 24b – f). Cuarto, el uso de galunisertib – un inhibidor del TGF- β – favorece la proliferación de células tumorales (al inhibir la diferenciación espontánea), pero a la vez parecía inhibir la supervivencia de los fibroblastos, aunque esta observación no era consistente en todos los experimentos. Por lo tanto, su uso es problemático en los cultivos de los ALIOs.

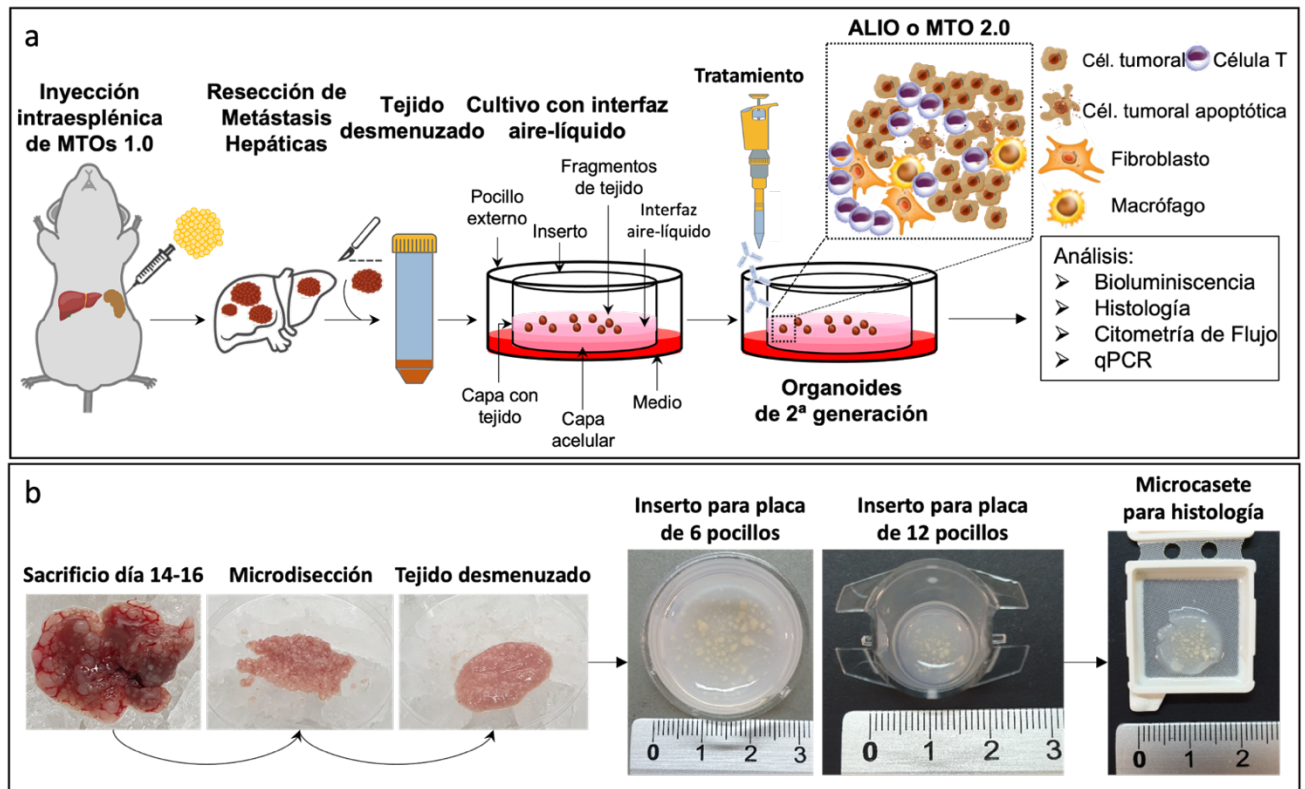


Figura 23 | Esquema de la generación de cultivos ALIO

a-b, Esquema de un experimento típico con cultivos con interfaz aire-líquido. Sacrificio del animal entre día 14 y 16. Después del explante de los hígados y microdissección de las metástasis, estas se disgregan mecánicamente con un bisturí hasta que el tejido esté casi líquido (no más de 10 minutos para evitar un daño tisular excesivo). El tejido homogeneizado se resuspende en una matriz (colágeno, BME, o mezcla de ambos) con una ratio de 1:10 y se coloca encima de una capa de matriz acelular del mismo material previamente preparada dentro de un inserto. Se usan insertos adaptados para placas de 6 y 12 multipocillos. Al final del experimento, se fija el tejido con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 16 horas. Al día siguiente, se extrae la matriz del inserto y se coloca en un microcasete de histología. Para más detalles, ver capítulo de ‘Material y Métodos’.

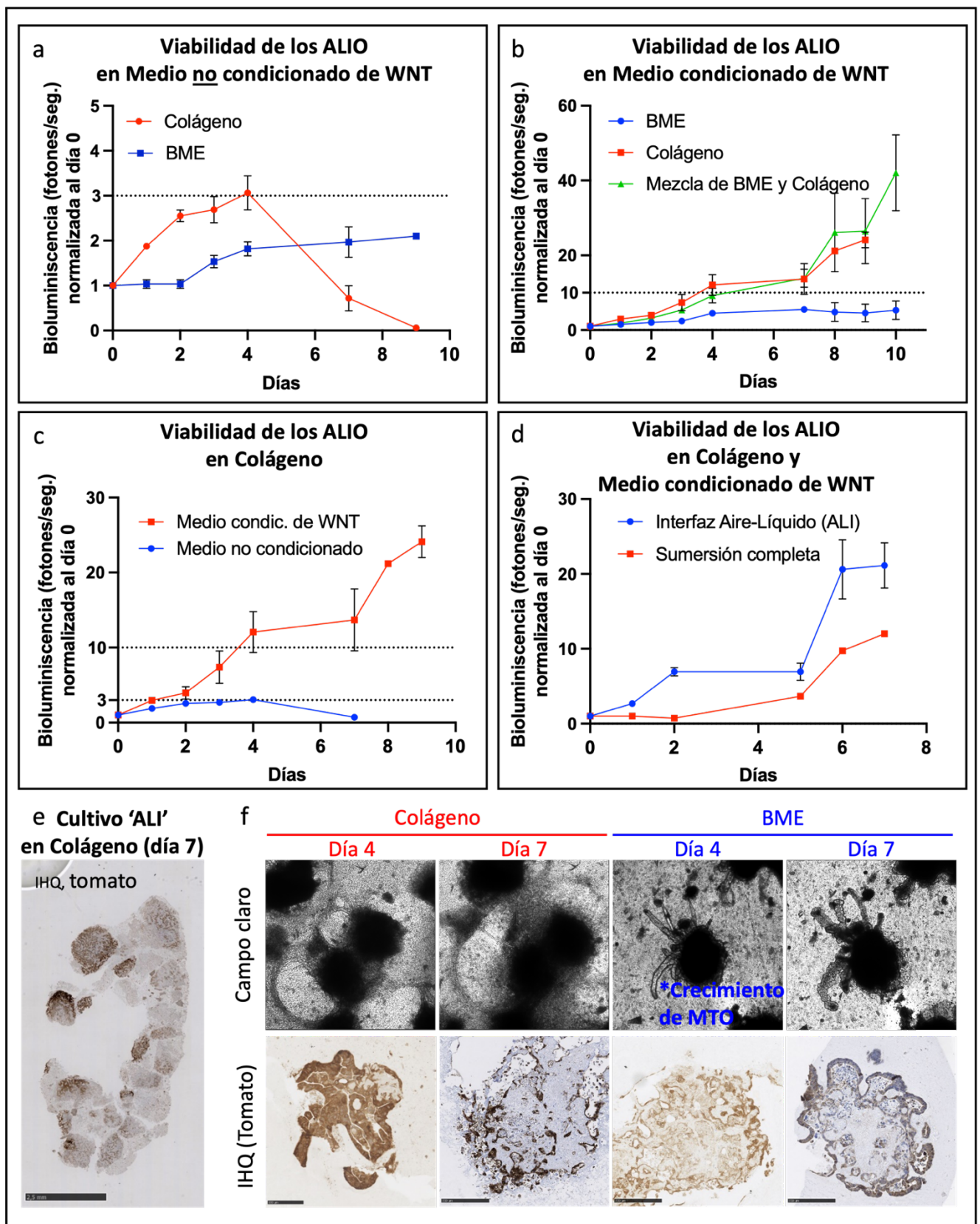


Figura 24 | Optimización de las condiciones de cultivo

a – d, Evolución de la bioluminiscencia de las células tumorales como marcador de viabilidad en diferentes matrices y con medios de cultivo; en fotones por segundo, normalizada al día 0. **e**, Aspecto de un cultivo 'ALI' en colágeno tras 7 días de cultivo (inmunohistoquímica [IHQ] para tomato como reportero de las células tumorales). Se observan unos 15 organoides de segunda generación (ALIOs). Barra de escala, 2,5 mm. **f**, Aspecto de un organoide en cultivo 'ALI' (ALIO) por microscopía de campo claro e IHQ para tomato comparando su cultivo en colágeno y en BME. *Crecimiento espiculado desde su centro más denso hacia la periferia. Barras de escala, 250 μ m.

3.3.3. Caracterización de los ALIOs

La caracterización de la composición celular de los organoides a diferentes tiempos (precoz y tardío) en comparación con las metástasis hepáticas originales se realizó una vez optimizadas las condiciones de cultivo. Notablemente, los ALIOs reflejaban la heterogeneidad entre las metástasis y se identificaron al menos cuatro fenotipos histológicos de metástasis y organoides diferentes (fig. 25 y 26):

- i. Organoides con una baja infiltración de células inmunes y un gran compartimento epitelial que proliferaba activamente (fig. 25a)
- ii. Organoides en que las células epiteliales eran menos abundantes y mostraban una intensa presencia de fibroblastos (fig. 25b)
- iii. Organoides con un compartimento epitelial marginal y apoptosis en el centro con una alta infiltración de células mieloides (fig. 25c)
- iv. Organoides completamente necróticos, que sólo mostraban una fina capa externa de células tumorales epiteliales (fig. 26, paneles superiores correspondientes al organoide 2).

Estos fenotipos parecían mantenerse a lo largo del tiempo (hasta 10 días) aunque con una tendencia natural a la muerte celular tras períodos de cultivo prolongados, a pesar de refrescar el medio de cultivo a diario (fig. 26). Finalmente, se intentó pasar los organoides mediante una ligera digestión, pero se observó que, mientras las células epiteliales sobrevivían bien, se perdía casi completamente el microambiente tumoral. Por lo tanto, se descartó pasar los cultivos.

El análisis de la composición del microambiente tumoral mediante citometría de flujo representó un desafío dada la gran dificultad de obtener un número adecuado de células vivas en el citómetro de flujo, incluso a partir de cultivos mostrando una buena viabilidad por bioluminiscencia y por microscopía de inmunofluorescencia. Se testaron diferentes protocolos de digestión y disociación mecánica lo que consiguió aumentar el rendimiento del número absoluto de células vivas, si bien el porcentaje continuó siendo inferior al 10% (fig. 35). Sin embargo, independientemente del protocolo aplicado, era evidente una tendencia al aumento de la fracción epitelial (EpCAM+), mientras que la fracción de células inmunes (CD45+) disminuía a lo largo del tiempo, manteniéndose estable la fracción de los linfocitos T (CD3+) (fig. 34a).

Figura 25 (siguiente página) | Caracterización histológica de tres fenotipos diferentes (a – c) de metástasis hepáticas y de tres ALIOs reminiscentes de las metástasis
Inmunohistoquímica (IHQ) para Epcam (células tumorales epiteliales), Ki67 (proliferación), α SMA (fibroblastos asociados al cáncer), CD3 (células T), caspasa-3 (apoptosis) y/o CD11b (macrófagos asociados al cáncer). Se muestra el fenotipo de la metástasis hepática (panel de arriba) y el ALIO con un fenotipo reminiscente de la metástasis (panel de abajo). Ver texto para detalles descriptivos. Barras de escala, 250 μ m. ►

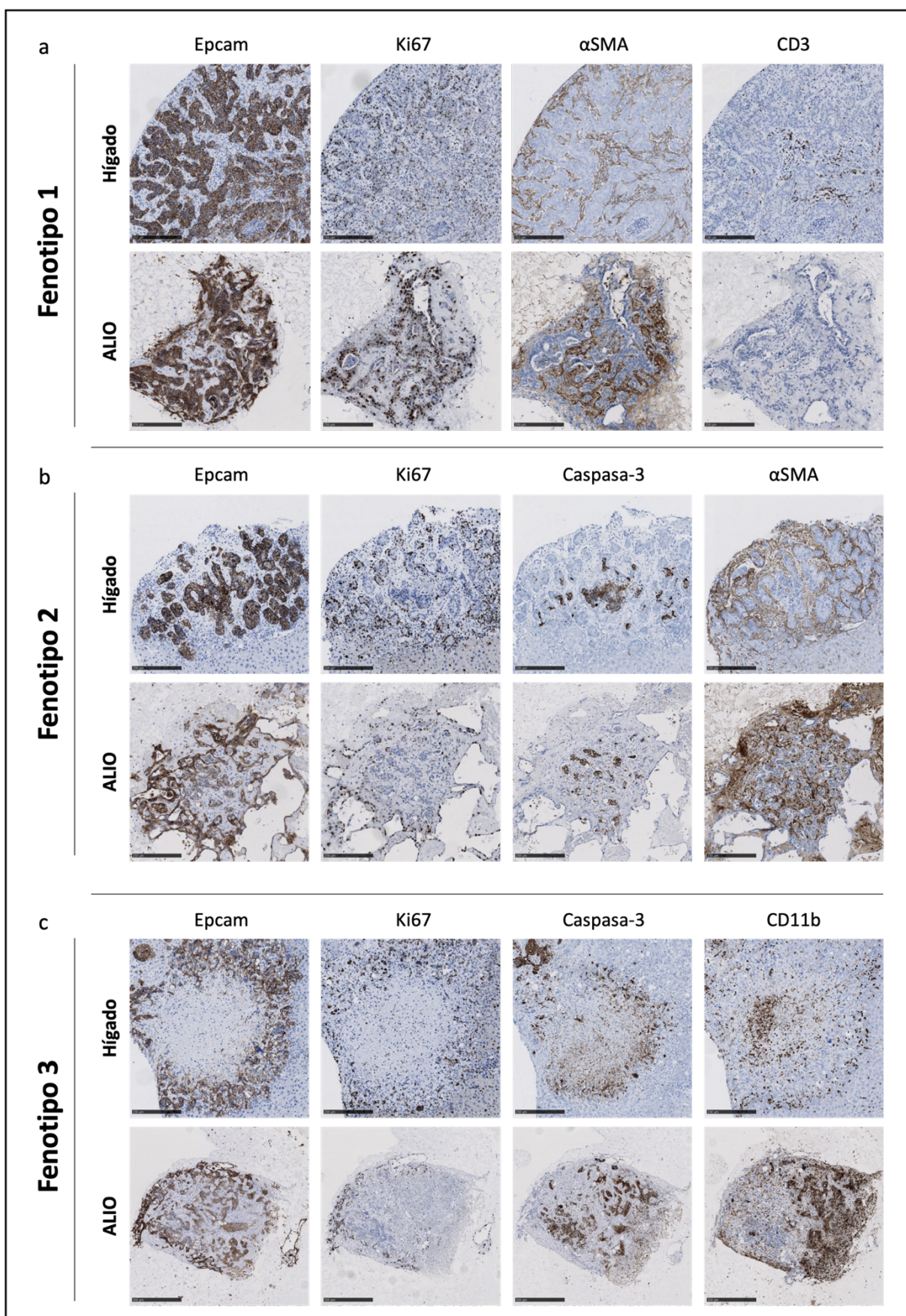


Figura 25 | Caracterización histológica de tres fenotipos diferentes (a – c) de metástasis hepáticas y de tres ALIOs reminiscentes de las metástasis
 Para descripción, ver página anterior.

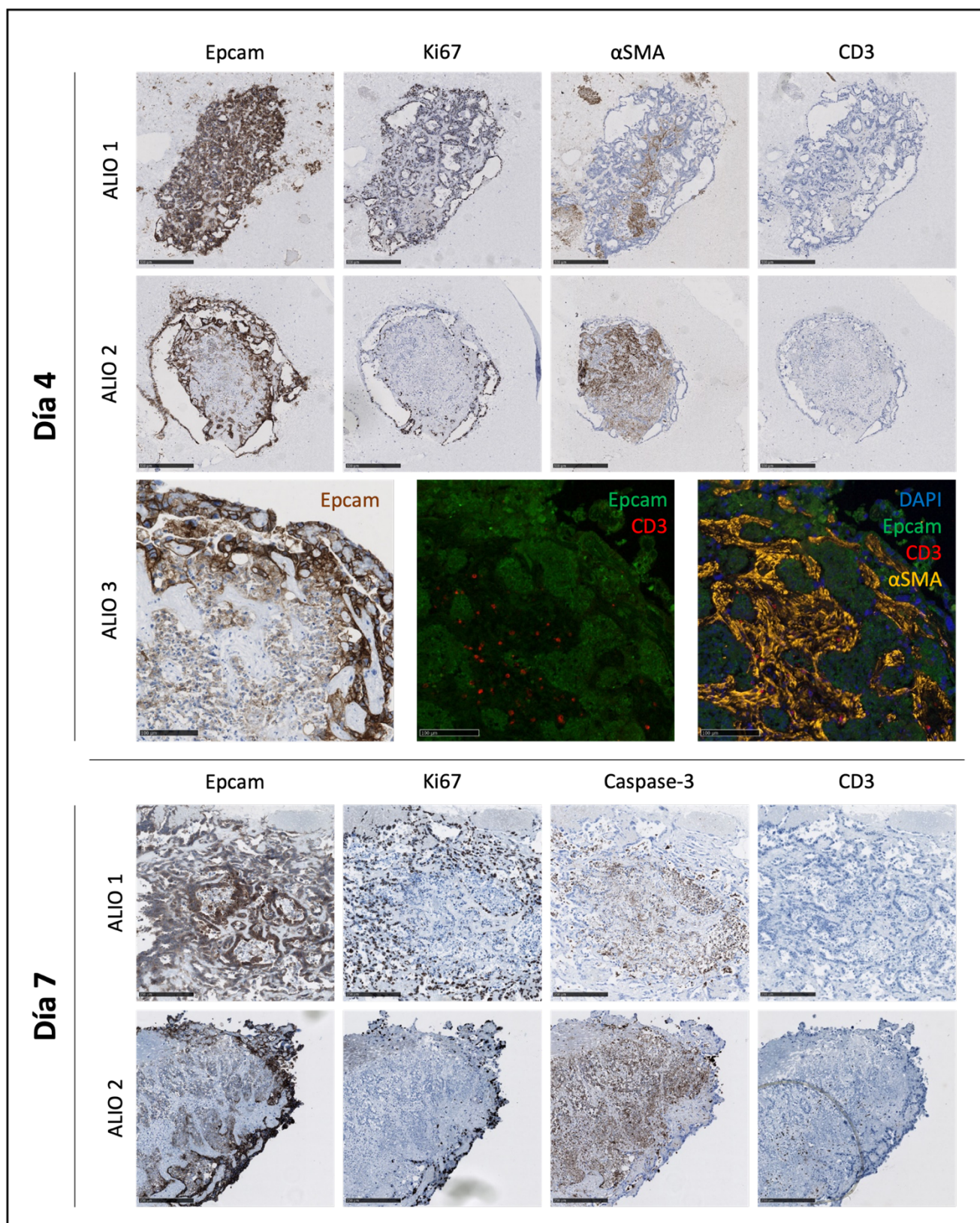


Figura 26 | Caracterización histológica de los ALIO al día 4 y al día 7 de su cultivo

Inmunohistoquímica (IHQ) o inmunofluorescencia (IF) para Epcam (células tumorales), Ki67 (proliferación), α SMA (fibroblastos), CD3 (células T) y/o caspasa-3 (apoptosis). Tanto al día 4 como al día 7 se siguen observando diferentes fenotipos de organoides. Los organoides 1 del día 4 y del día 7 continúan proliferando (demostrado por la positividad para Ki67), pero al día 7 el fenotipo ►

Figura 26 (continuación)

apoptótico es más prevalente que el proliferativo (demostrado por la positividad para la caspasa-3). Al día 4 existen organoides con un centro apoptótico, particularmente aquellos con una intensa infiltración por fibroblastos (α SMA). Mientras que al día 4 aún se observan organoides infiltrados por células T, al día 7 ya se han perdido estas células en prácticamente todos los organoides. Barras de escala, 250 μ m.

3.3.4. El Efecto de la Inmunoterapia sobre los ALIOs

El objetivo de esta fase del proyecto fue comprobar la utilidad de los ALIOs como modelo preclínico para testar tratamientos dirigidos contra componentes del MAT y no contra las células epiteliales como es el caso de las quimioterapias convencionales. Para este fin, se trataron ALIOs con anticuerpos anti-PD-1 (10 μ g/ml), anti-PD-L1 (10 μ g/ml), galunisertib en diferentes concentraciones (4, 20 y 100 μ M), combinación de galunisertib y anti-PD-1 o anti-PD-L1, y control (IgG [10 μ g/ml] + vehículo [DMSO]) (fig. 27a). Galunisertib se incluyó en estos experimentos para inhibir la señalización mediada por TGF- β , ya que el equipo del Dr. Batlle había demostrado previamente que la inhibición del TGF- β aumenta la eficacia de las terapias anti-PD-1 o anti-PD-L1 (303).

En estos experimentos, se observó que después de una fase inicial de crecimiento tumoral similar para todas las condiciones, tanto el tratamiento con anti-PD-1 como con anti-PD-L1 inducía una importante disminución de la viabilidad a partir del día cuatro (fig. 27b – c). Normalizada al día cero y comparada con el control, la viabilidad de los organoides tratados con anti-PD-1 o con anti-PD-L1 era del 27% y 33%, respectivamente ($P < 0,01$). Además, confirmamos que este efecto no dependía de la activación previa de los linfocitos con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (fig. 28a). Si bien existía una tendencia hacia una menor viabilidad con activación previa, estas diferencias no eran estadísticamente significativas, con la excepción de los organoides tratados con galunisertib (fig. 28a).

En contraposición al efecto observado con anti-PD-1 y anti-PD-L1, el galunisertib en monoterapia no repercutía en la viabilidad de los organoides. De hecho, en la mayoría de los experimentos el galunisertib parecía favorecer el crecimiento y mantenimiento de las células tumorales (fig. 27b). El tratamiento combinado de galunisertib y anti-PD-1 o anti-PD-L1 reducía la viabilidad de los organoides a niveles similares a los observados con las monoterapias (a un 20% comparado con el control en ambos casos) de forma que el galunisertib no parecía aportar ningún efecto (fig. 27b – c). La inmunohistoquímica de CD3 confirmó la infiltración de los organoides por células T bajo tratamiento con anti-PD-L1 (fig. 28c). La inmunofluorescencia con anticuerpos contra Ki67 confirmó que los organoides tratados con inmunoterapia carecían de células proliferativas y que, en su lugar, la práctica totalidad del organoide presentaba un estado mayoritariamente apoptótico y no sólo en su centro (ilustrado por la intensa expresión de la caspasa-3) (fig. 29).

Los experimentos anteriormente explicados se ejecutaron con muestras de metástasis hepáticas generadas a partir de la inyección del organoide murino MTO129. Se reprodujeron estos experimentos con metástasis generadas a partir de otro organoide murino de la colección de nuestro laboratorio – el MTO204. Este conlleva las mismas mutaciones que el MTO129 (es decir *Apc*, *Kras*, *Trp53*, y *Tgfbr1*), pero se derivó a partir del CCR de un ratón diferente. En los experimentos *in vivo* mostraba un comportamiento invasivo igual que el MTO129, pero era menos sensible a la inmunoterapia. Sin embargo, cuando se trataron los ALIOs del MTO204 con inmunoterapia, éstos mostraban respuestas muy similares al MTO129 (fig. 28b).

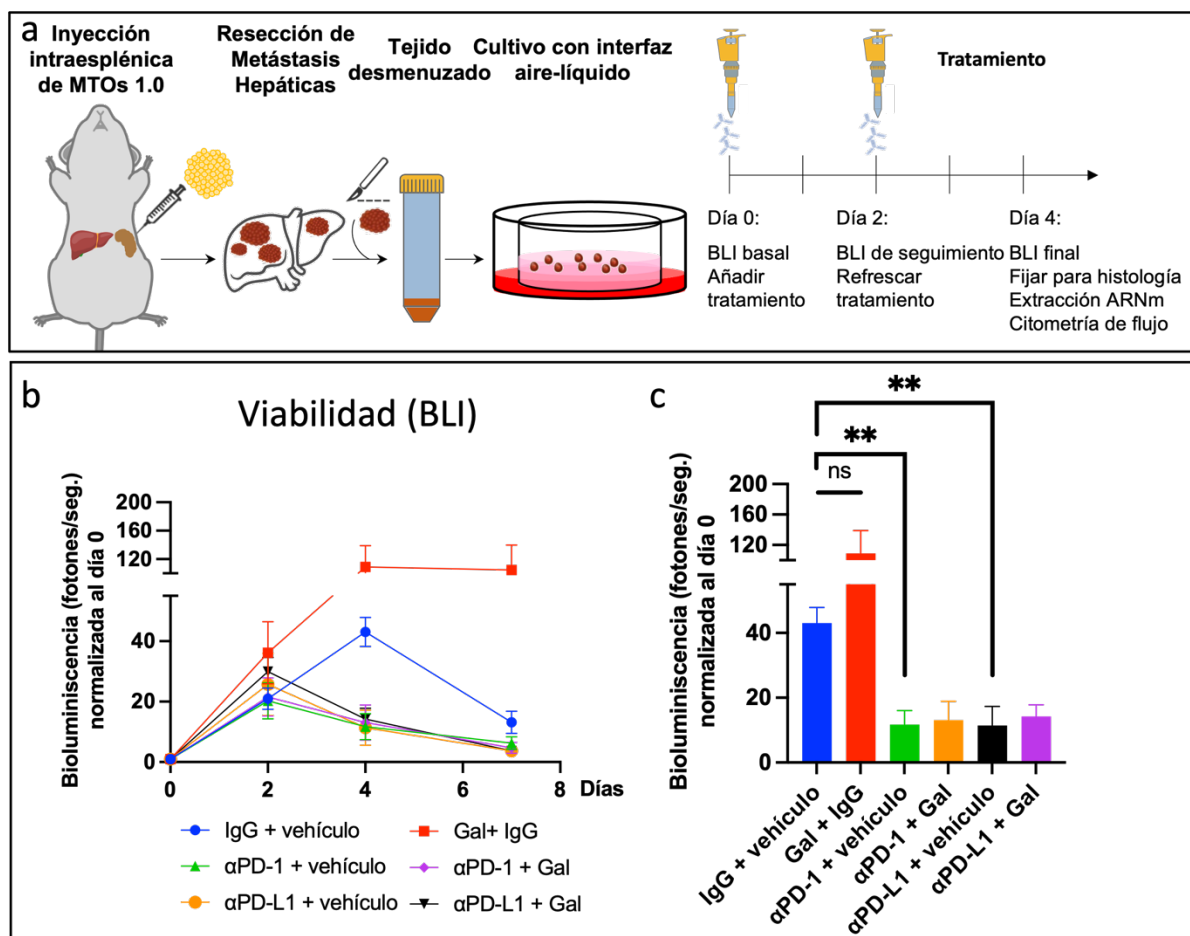


Figura 27 | Efectos de la inmunoterapia sobre los ALIOs *in vitro* (I)

a, Configuración experimental. Tras poner los organoides 2.0 en cultivo con interfaz aire-líquido (ALIO) y realizar una medición basal de la bioluminiscencia ('BLI', del inglés Bioluminescence Imaging), al día cero, se añadió el tratamiento al medio de cultivo. Al día dos se realizó una segunda medición y se refrescó el medio con tratamiento. Evaluación final de la respuesta al día 4. **b**, Evolución de la viabilidad medida por BLI en fotones por segundo a lo largo de siete días, normalizada al día cero, con los ALIOs generados a través de metástasis hepáticas del MTO129 y sometidos a los tratamientos indicados. Gráfica representativa de siete experimentos independientes con al menos cuatro réplicas por condición. Media $\pm$ EEM (abreviado de error estándar de la media).►

Figura 27 (continuación)

c, Viabilidad al día cuatro, medida por BLI y normalizada al día cero, para los tratamientos indicados. ** $P < 0,01$.

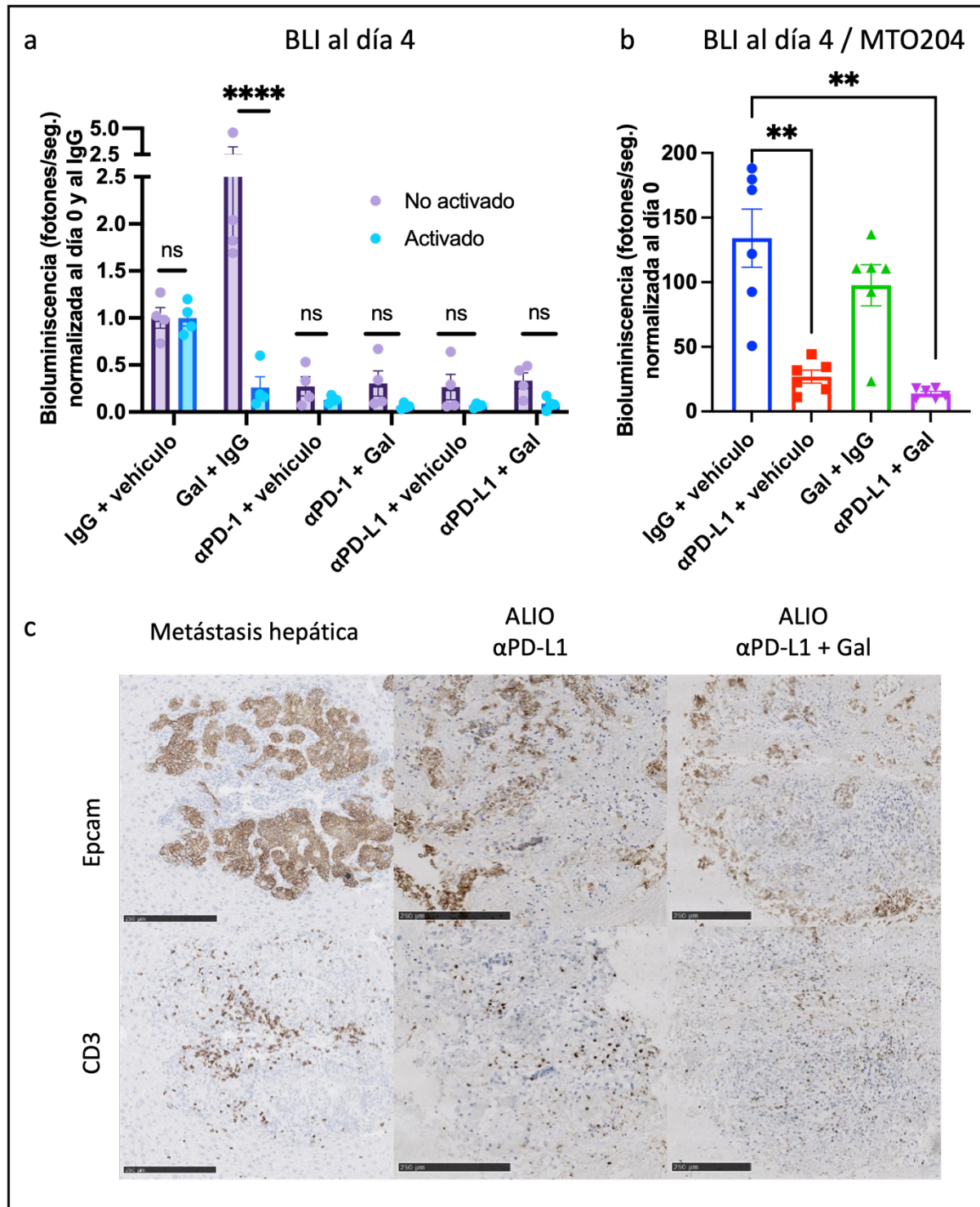


Figura 28 | Efectos de la inmunoterapia sobre los ALIOs *in vitro* (II)

a, Viabilidad al día cuatro, medida por BLI y normalizada al día cero y al control (IgG + vehículo) comparando los ALIOs que habían sido activados mediante α CD3 y α CD28 con los que no habían sido activados. Gráfica representativa de dos experimentos ►

Figura 28 (continuación)

independientes con al menos cuatro réplicas por condición. Media $\pm$ EEM. **** $P < 0,0001$.

b, Viabilidad al día cuatro, medida por BLI en fotones por segundo y normalizada al día cero, con los ALIOs generados a través de metástasis hepáticas del MTO204 y sometidos a los tratamientos indicados. Gráfica representativa de dos experimentos independientes con seis réplicas por condición. Media $\pm$ EEM. ** $P < 0,01$. **c**, Inmunohistoquímica para Epcam (células tumorales) y CD3 (linfocitos T). Metástasis hepática representativa que muestra infiltración linfocítica y una arquitectura intacta de las células epiteliales (derecha). Mantenimiento de la infiltración linfocítica y destrucción del componente epitelial bajo inmunoterapia con α PD-L1 (medio) y α PD-L1 + galunisertib (derecha). Barras de escala, 250 μ m.

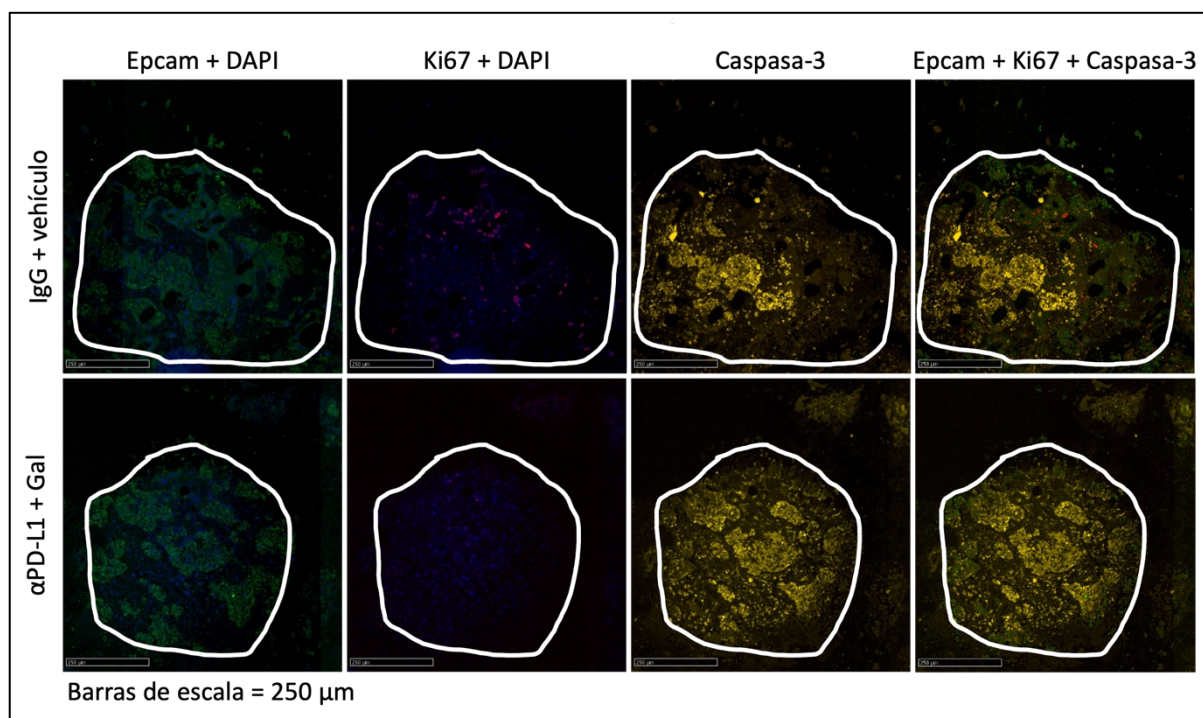


Figura 29 | Efectos de la inmunoterapia sobre los ALIOs *in vitro* (III)

Inmunofluorescencia para DAPI (núcleos, azul), Epcam (células tumorales, verde), Ki67 (proliferación, rojo) y caspasa-3 (apoptosis, amarillo) comparando un ALIO tratado con control (IgG + vehículo) y con doble inmunoterapia (α PD-L1 + galunisertib). Desaparición completa de la proliferación y apoptosis de la totalidad del ALIO sometido a inmunoterapia. Barras de escala, 250 μ m.

En ALIOs generados a partir de metástasis hepáticas derivadas de ratones atímicos suizos ('*swiss nude*', los cuales carecen de sistema inmune adaptativo) no se observó diferencia alguna entre el tratamiento con anti-PD-L1 y el control sugiriendo que el efecto observado anteriormente en ratones inmunocompetentes era verdaderamente inmunomediado y no un efecto meramente tóxico de los anticuerpos (fig. 30a – b). La histología e inmunohistoquímica confirmaron que los ALIOs se encontraban en buenas condiciones, independientemente del tratamiento aplicado (fig. 30c).

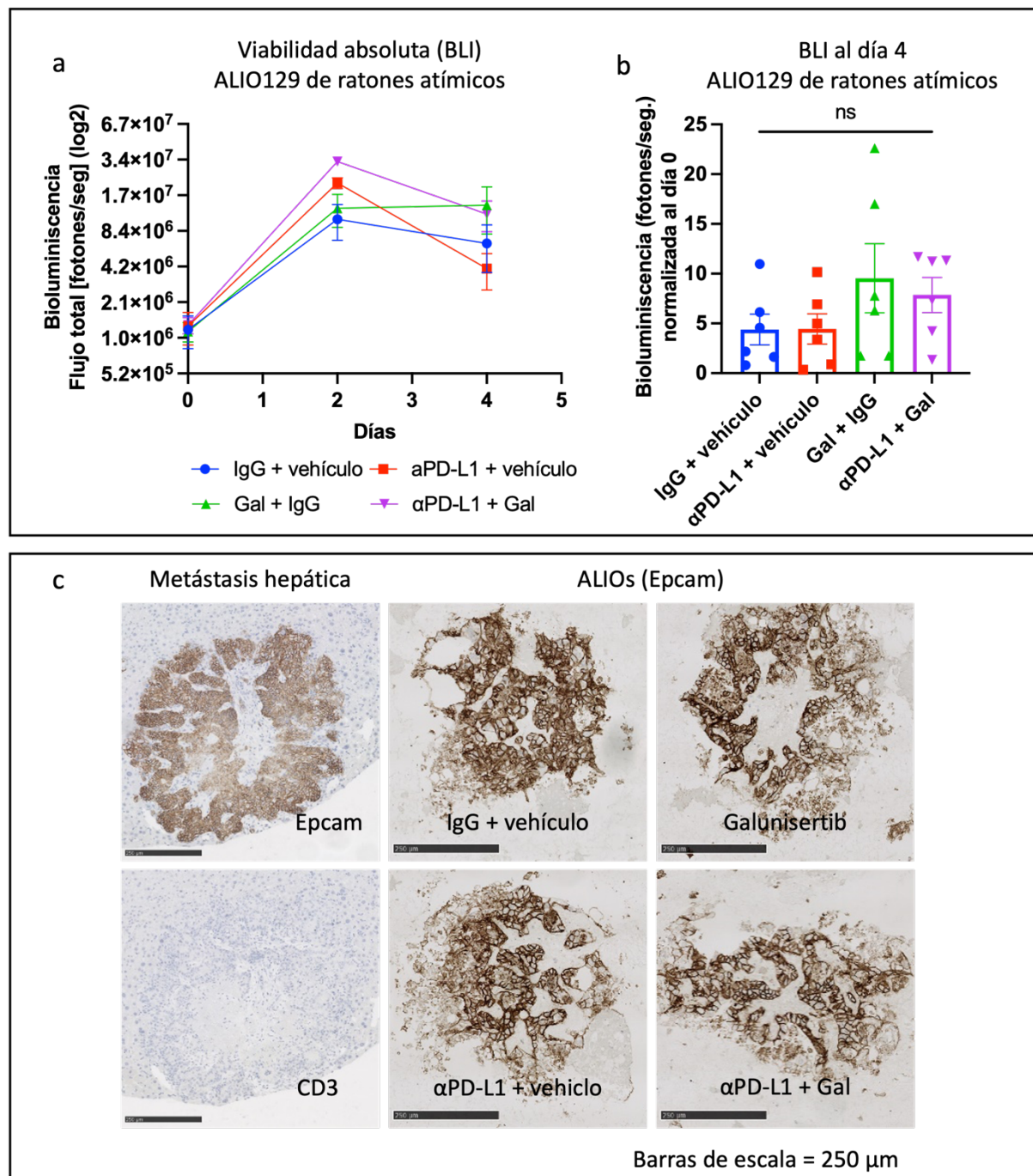


Figura 30 | Efectos de la inmunoterapia sobre ALIOs provenientes de ratones atímicos
a-b, Efectos de la inmunoterapia sobre la viabilidad de los ALIOs derivados de metástasis hepáticas en ratones atímicos ('*swiss nude*') medida por BLI (fotones/segundo, ►

Figura 30 | (continuación)

normalizada al día cero). Gráfica representativa de dos experimentos independientes con seis réplicas por condición. Media $\pm$ EEM. ns, no significativo. **c**, Inmunohistoquímica (IHQ) para Epcam (células epiteliales) y CD3 (linfocitos T). La metástasis hepática original no muestra ningún linfocito (izquierda). Los correspondientes ALIOs muestran una arquitectura epitelial intacta independientemente del tratamiento aplicado. Barras de escala, 250 μ m.

El tratamiento de los ALIOs con el doble de la concentración del anti-PD-L1 (20 μ g/ml vs. 10 μ g/ml), resultó en una menor viabilidad relativa al control: 6,1% vs. 25%, respectivamente ($P=0,0071$), sugiriendo una relación dosis-efecto (fig. 31a). En cambio, el aumento, incluso a dosis muy altas de galunisertib (5, 20 y 100 μ M) no causó efecto alguno (fig. 31b) – un hallazgo en contraposición a las observaciones en los experimentos *in vivo*, en los que tres dosis de galunisertib intraperitoneales fueron capaces de inducir una cierta infiltración linfocítica y reducir significativamente el número de metástasis, si bien no curaba a los animales (fig. 32, reproducida de Tauriello D et al., *Nature*, 2018).

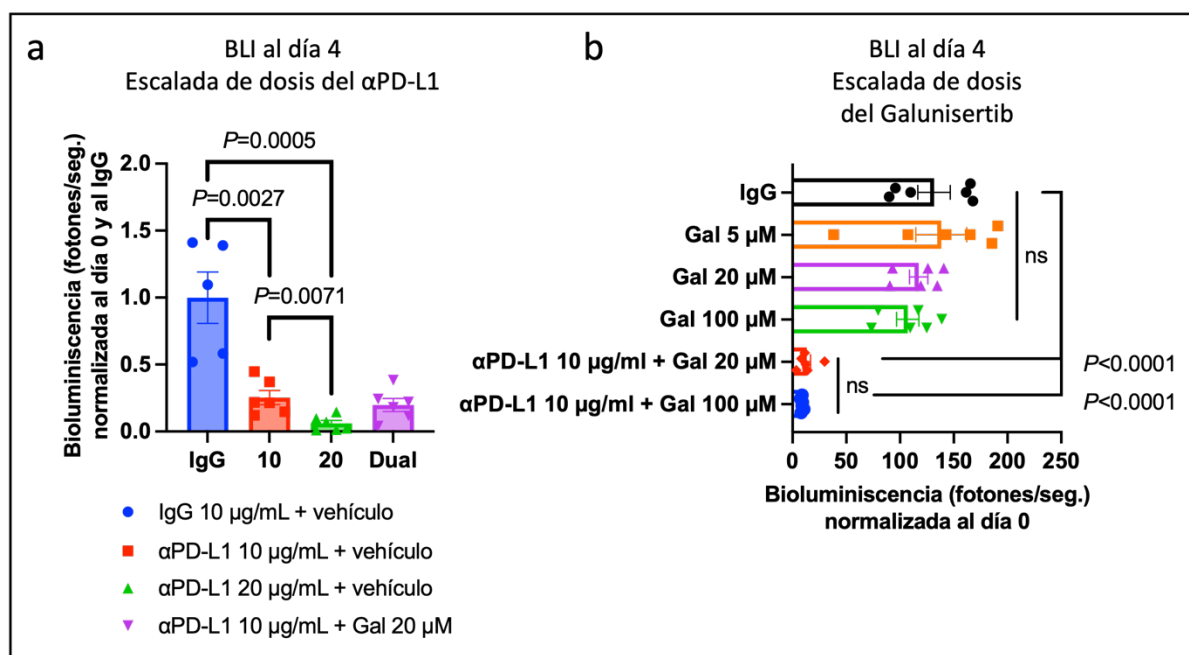


Figura 31 | Escalada de dosis de la inmunoterapia en ALIOs

a – b, efectos con dosis altas de α PD-L1 (**a**) y de galunisertib (**b**) sobre ALIOs derivados de ratones C57BL/6j. **a**, BLI en fotones por segundo, normalizada al día cero y al IgG. **b**, BLI en fotones por segundo, normalizada al día cero. ns, no significativo.

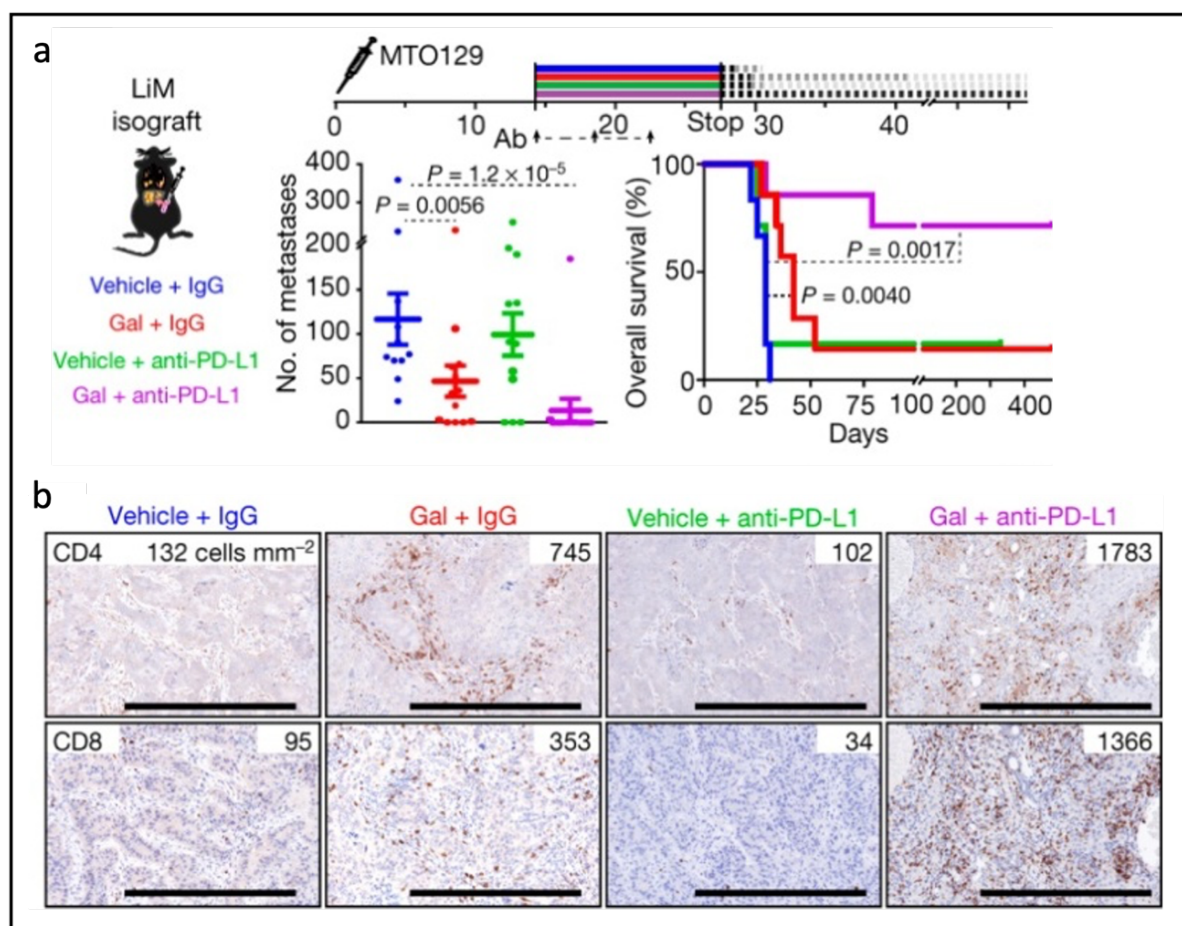


Figura 32 | Efectos de la inmunoterapia en ratones *in vivo*

Tratamiento de ratones C57BL/6j con metástasis hepáticas tras inyección del MTO129 de forma intraesplénica (día 0). Se empezó la inmunoterapia (Ab) al día 14 del crecimiento metastásico, se continuó durante 14 días y se realizó seguimiento posterior de los ratones durante >400 días. **a**, Número de metástasis por hígado (izquierda) y sobrevivencia global (curva de Kaplan-Meier, derecha) según los diferentes tratamientos. Azul, control (vehículo + IgG); rojo, galunisertib + IgG; verde, vehículo + anti-PD-L1; lila, galunisertib + anti-PD-L1. **b**, Inmunohistoquímica demostrando la infiltración tumoral por linfocitos T colaboradores (CD4, panel de arriba) y citotóxicos (CD8, panel de abajo) bajo los tratamientos indicados. El número en cada foto indica la densidad de células por mm². Barras de escala, 500 μ m. Figura reproducida de Tauriello D et al., *Nature* (2018), doi: 10.1038/nature25492

Por último, observamos que las metástasis hepáticas pequeñas se encontraban mucho más infiltradas por células T que las metástasis de mayor tamaño, que mayoritariamente presentaban un fenotipo inmunoexcluido (fig. 33a). Basándonos en estas observaciones, planteamos la hipótesis de que cultivos generados a partir de metástasis pequeñas podrían mostrar una respuesta a la inmunoterapia más intensa. Primero, observamos que los cultivos derivados de metástasis pequeñas mostraban un crecimiento mucho más rápido que aquellos derivados de metástasis grandes, de forma que su señal de bioluminiscencia era seis veces más elevada al día cuatro (fig. 33b – c). Sorprendentemente, detectamos esta diferencia en

el crecimiento a pesar de que ambos cultivos – derivados de metástasis pequeñas o grandes, partían de la misma cantidad de tejido. En cuanto al efecto del tratamiento, la inmunoterapia combinada causaba una reducción más intensa de la viabilidad de los organoides derivados de metástasis pequeñas comparados con las grandes, si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa (93,4% vs. 80,1%; $P=0,056$) (fig. 33c – d).

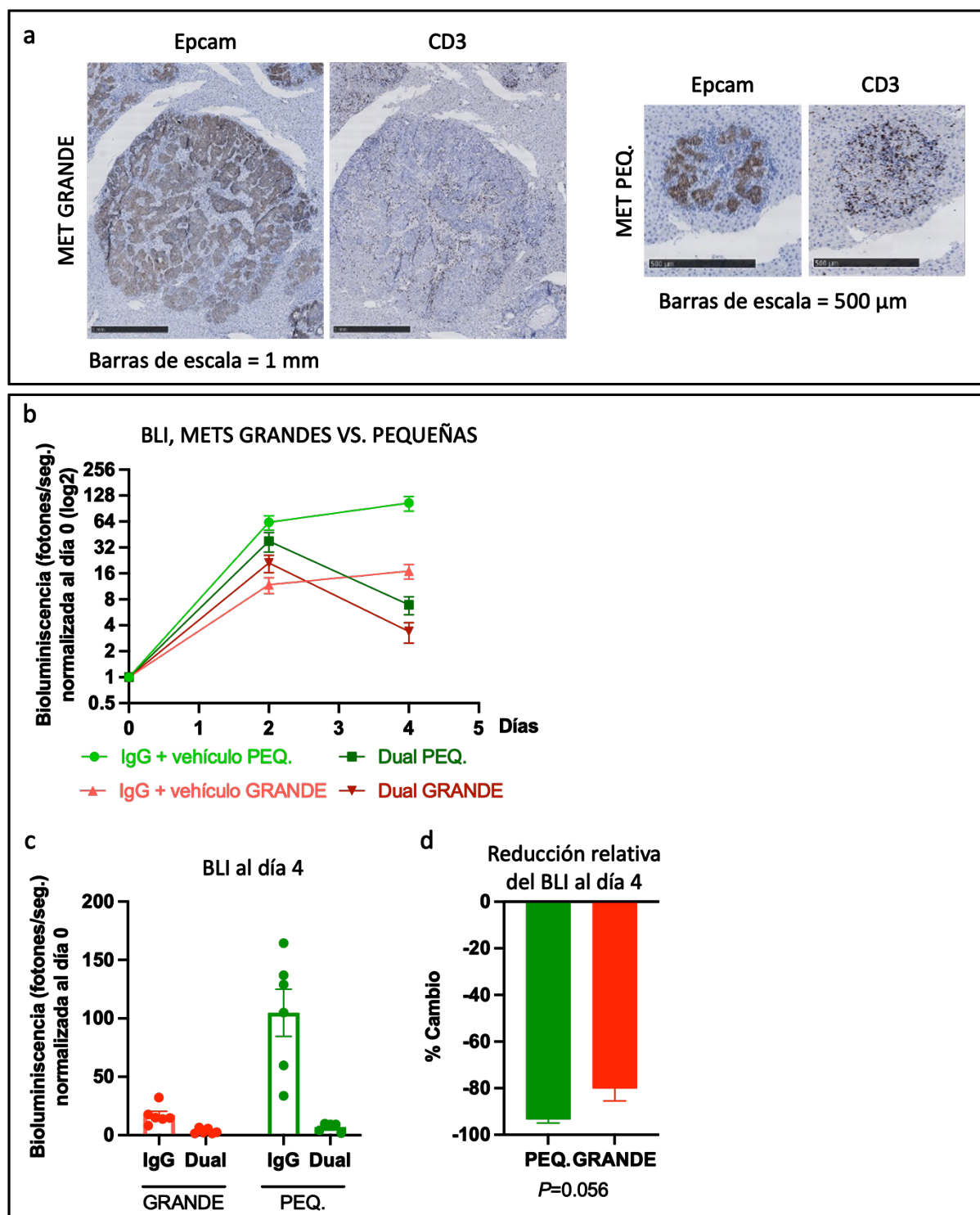


Figura 33 | Respuesta en ALIOs derivados de metástasis grandes vs. pequeñas

a, Inmunohistoquímica para Epcam (células epiteliales) y CD3 (linfocitos) de una metástasis hepática grande (izquierda; barra, 1 mm) y pequeña (derecha; barra, 500 µm).



Figura 33 (continuación)

Las fotos confirman la mayor densidad de infiltración por células T (CD3+) en las metástasis pequeñas. **b – d**, efectos de la inmunoterapia sobre la viabilidad de los ALIOs derivados de metástasis hepáticas grandes comparado con pequeñas, medida por BLI en fotones por segundo, normalizada al día cero. Seis réplicas por condición. Media $\pm$ EEM.

Los tratamientos con inhibidores de los puntos de control inmunitario – como son los anticuerpos contra el PD-1 o el PD-L1, constituyen sólo una de múltiples estrategias potenciales para manipular el microambiente tumoral con la intención de restablecer la respuesta inmune contra las células cancerígenas. Los mecanismos de la evasión inmune por parte del tumor son complejos y la investigación básica sigue revelando más actores celulares y moleculares que juegan un papel y podrían ser, por tanto, potenciales dianas terapéuticas. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que sólo una terapia combinada con un inhibidor del TGF- β y del PD-L1 fue capaz de curar a los ratones con metástasis hepáticas (fig. 32, Tauriello D et al., *Nature*, 2018)(303). Por otro lado, un grupo de la Universidad de Michigan demostró recientemente que las metástasis hepáticas aumentaban el número de macrófagos CD11b+ y que estas células tenían un efecto inmunoinhibidor induciendo la apoptosis en las células T citotóxicas a través de la señalización del ligando FAS. Además, demostraron que sólo el doble bloqueo – es decir, del PD-L1 de la célula T y del macrófago CD11b+, era capaz de generar una respuesta contra el tumor y no los dos tratamientos en monoterapia (Yu J et al., *Nature Medicine*, 2021) (276).

Dado que en los experimentos anteriormente explicados no se observó un claro efecto del galunisertib, nos preguntamos si el sistema de cultivo ALIO era capaz de reproducir *in vitro* los resultados de los tratamientos dirigidos contra los macrófagos del estudio mencionado, sobre todo porque en nuestras metástasis hepáticas también se observó una intensa infiltración por células CD11b+ y que, incluso, su número relativo a la totalidad de las células inmunes (CD45) aumentaba en cultivo mientras que el de las células T disminuía (fig. 34a – b). En consonancia con los hallazgos del estudio citado, en los cultivos ALIO tampoco observamos ningún efecto del tratamiento con anti-CSF-1R en monoterapia y sólo un efecto no significativo con el anti-PD-L1 (fig. 34c). En lo que se refiere a las terapias combinadas, observamos una tendencia de efecto con doble terapia (anti-CSF-1R y anti-PD-L1) no significativa, mientras que el tratamiento triple entre anti-PD-L1, anti-CSF-1R y anti-TGF- β sí era muy significativo comparado con el control con una media de bioluminiscencia normalizada al día cero de 3,1 vs. 21,3 ($P=0,0026$) (fig. 34c).

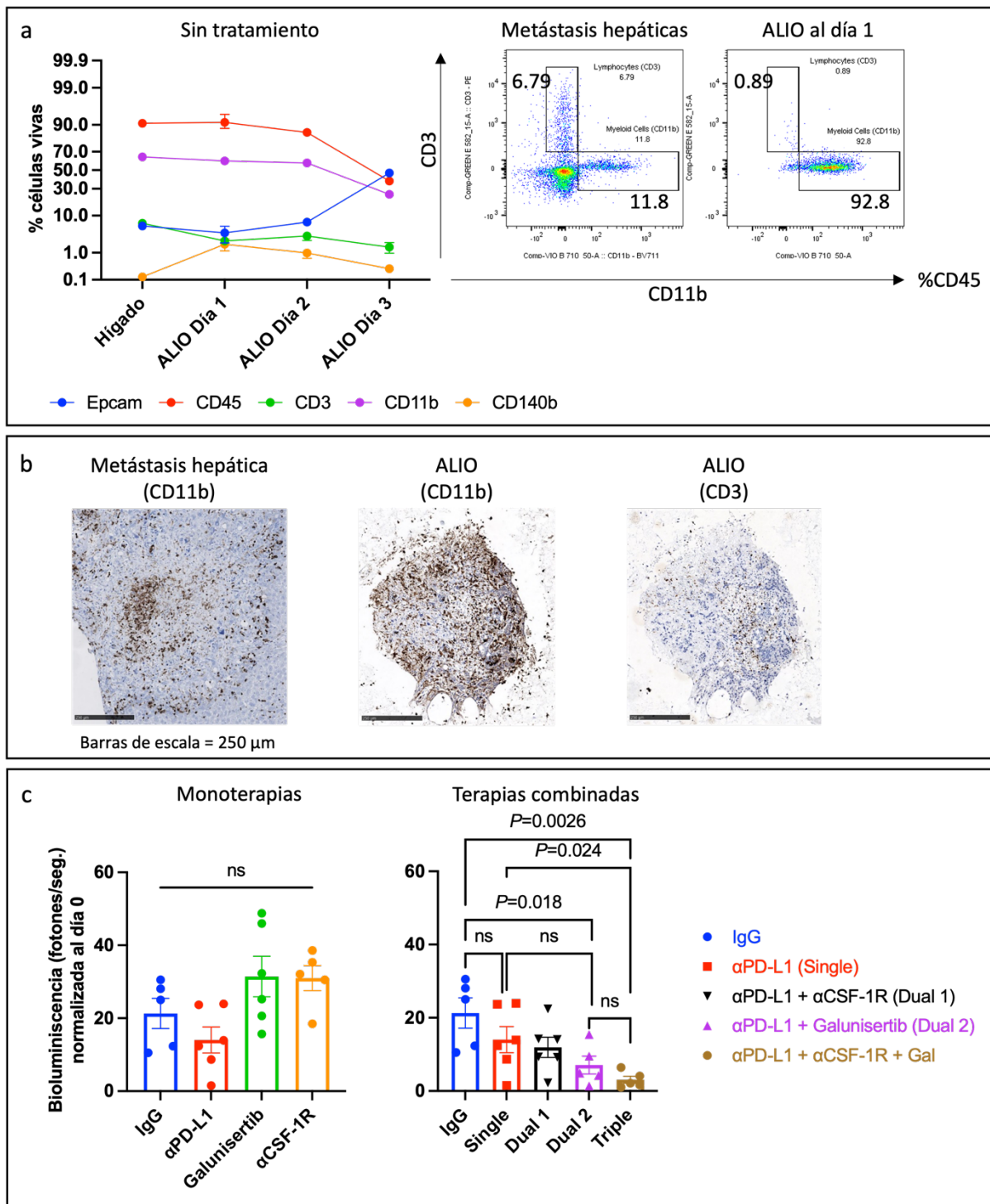


Figura 34 | Efectos de la triple inmunoterapia (adición de tratamiento dirigido a los macrófagos)

a, Variación de la composición de las metástasis en relación a las células epiteliales (Epcam), células del sistema inmune (CD45), linfocitos T (CD3), macrófagos (CD11b) y fibroblastos (CD140b) analizada por citometría de flujo tras la digestión de las metástasis hepáticas (hígado) y ALIOs en los días indicados. Los paneles de la derecha muestran un resultado representativo del análisis de linfocitos CD11b+. **b**, Imágenes representativas del análisis por inmunohistoquímica mostrando la presencia de macrófagos (CD11b) y linfocitos T (CD3) en dos ALIOs comparado con la metástasis original. Barra de escala, 250 μ m. **c**, Viabilidad de los ALIOs sometidos a los tratamientos indicados, ensayada por bioluminiscencia en fotones por segundo, normalizada al día cero. Gráfica representativa de dos experimentos independientes con seis réplicas por condición.

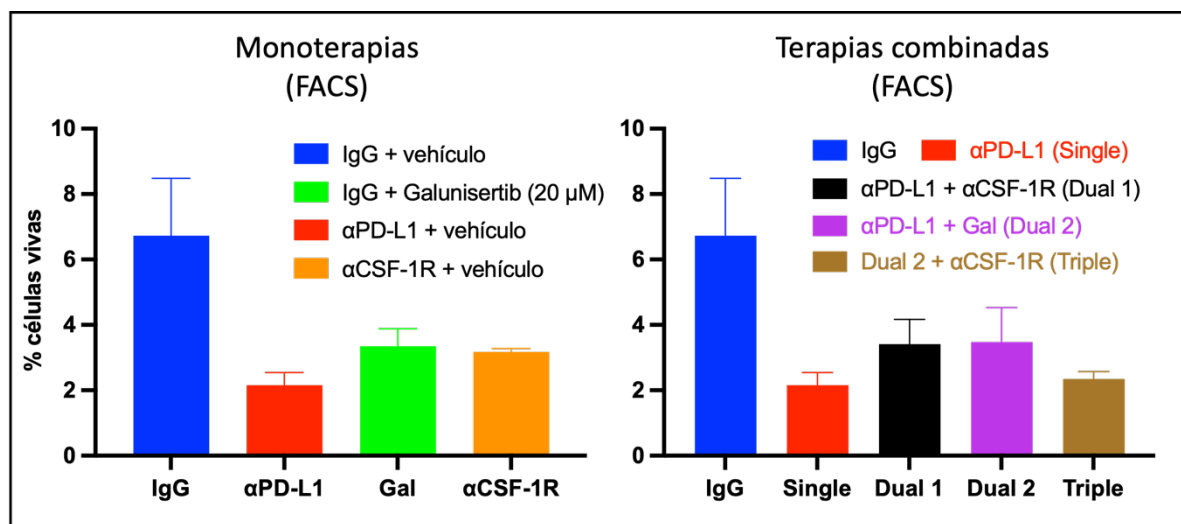


Figura 35 | Efectos de la triple inmunoterapia (adición de tratamiento dirigido a los macrófagos) medidos mediante citometría de flujo

La gráfica muestra la viabilidad al día 4 de los ALIOs sometidos a los tratamientos indicados, ensayada por citometría de flujo (FACS) y medida en porcentaje de células vivas del total de células individuales. Las muestras para este análisis provienen de los ALIOs del experimento de la figura 34, medidos mediante bioluminiscencia previo a su disagregación y preparación para la citometría de flujo. La gráfica demuestra la reducida cantidad de células vivas al día cuatro del cultivo ya bajo condiciones de control (IgG, <10%).

Anteriormente se ha mencionado que el hecho de que los ALIOs de metástasis derivadas de ratones que carecen de sistema inmune adaptativo no mostraran respuesta a la inmunoterapia era sugestivo de un efecto verdaderamente inmunomediado. Adicionalmente, nos propusimos demostrar de forma directa la sobreexpresión de marcadores de activación en las células T. Esta tarea presentó dificultades técnicas, ya que la calidad del ADN complementario (cDNA) para el estudio de expresión génica era claramente subóptima tras la extracción del ARN de los ALIOs. Hipotetizamos que la intensa muerte celular inducida por el tratamiento y por las condiciones del cultivo al cuarto día causaba demasiada fragmentación del ARN por las ARNasas. Para solucionar este problema, se intentó tratar a los organoides con dosis más altas del anti-PD-L1 para inducir una respuesta más rápida y extraer el ARNm a las 48 horas cuando los cultivos todavía se encontraban en buenas condiciones. La bioluminiscencia confirmó un efecto significativo del tratamiento combinado entre anti-PD-L1 y galunisertib al día dos (fig. 36a). Sin embargo, a pesar de la optimización del protocolo, sólo se pudo demostrar una sobreexpresión de algunos marcadores, pero no de todos ellos. Se detectó un aumento de los marcadores CD3, CD8 y granzima B, mientras que este incremento en la expresión no fue evidente para la perforina ni para el interferón gamma (fig. 36b). Es más, en los tratamientos que contenían el inhibidor del TGF- β (galunisertib solo o galunisertib + anti-PD-L1), pero no con anti-PD-L1 en monoterapia, se observó una disminución de la expresión del α SMA – marcador de fibroblastos activados y asociados al cáncer, de los que se ha hipotetizado en la literatura y en nuestro laboratorio que tienen un importante efecto inmunoinhibidor. Si bien la ausencia de respuesta en cultivos

derivados de ratones sin inmunidad adaptativa y la sobreexpresión de algunos marcadores de activación linfocítica sugirió un efecto inmunomediado, debemos admitir que la calidad del ARN en muchos casos fue subóptima y, por tanto, no permite extraer conclusiones definitivas.

En resumen, hemos probado un nuevo sistema de cultivo de cáncer *in vitro* que pretende mantener el microambiente tumoral y servir como herramienta para predecir la respuesta a diferentes tratamientos dirigidos contra éste, precisamente anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-TGF- β y anti-CSF-1R. Hemos demostrado que los organoides mantienen gran parte del microambiente y que los diferentes tratamientos son capaces de inducir una respuesta específica. Sin embargo, la respuesta observada en muchos casos no se corresponde con la respuesta observada en los experimentos *in vivo*, lo que hace cuestionar la utilidad de este sistema a día de hoy. Por ejemplo, anti-PD-L1 mostró un claro efecto en la mayoría de nuestros experimentos en monoterapia, lo que no se corresponde ni con los experimentos *in vivo* ni con los resultados de los ensayos con esta terapia en pacientes.

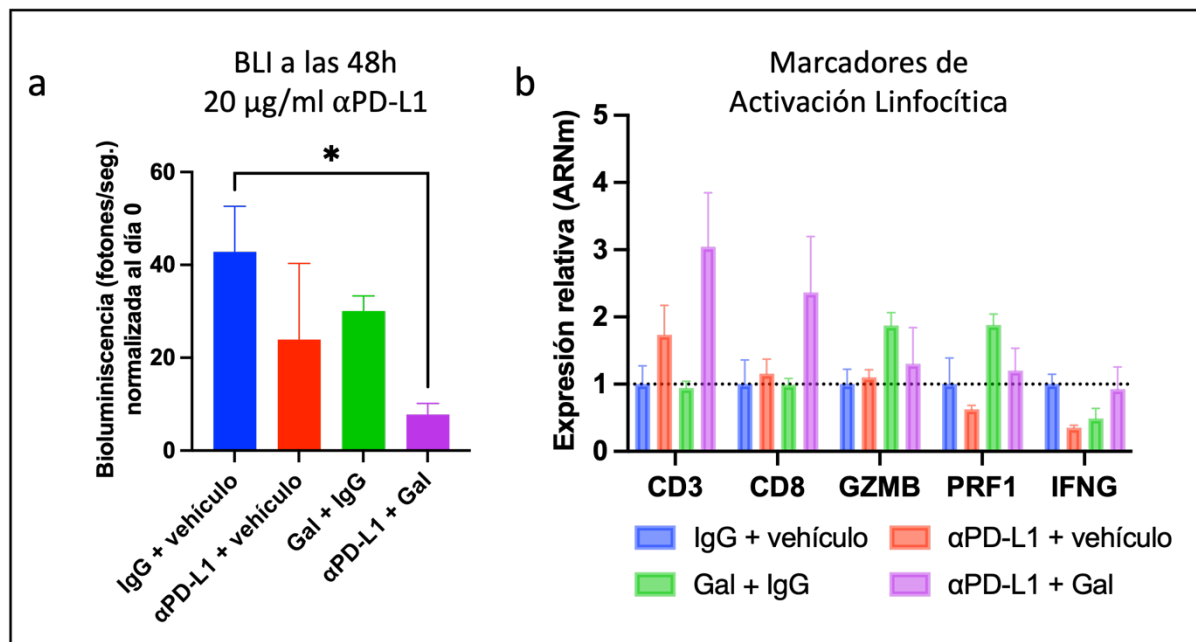


Figura 36 | Marcadores de activación linfocítica en los ALIOs

a, Viabilidad de los ALIOs tras 48 horas de tratamiento con las terapias indicadas, ensayada por bioluminiscencia (BLI) en fotones por segundo, normalizada al día cero. * $P < 0,05$. **b**, Efecto de los tratamientos indicados sobre marcadores de activación de células T analizados mediante PCR cuantitativa en muestras de ARNm. Referencia = IgG + vehículo. GZMB, granzima B; PRF1, perforina 1; IFNG, interferón gamma.

3.3.5. Cultivos Organotípicos.

Las dificultades para mantener una buena viabilidad de los organoides y la discordancia entre los resultados de los ALIOs y los experimentos *in vivo* nos motivaron a buscar sistemas *in vitro* alternativos. Muy recientemente, el grupo del Dr. Manuel Valiente del CNIO en Madrid describió otro tipo de cultivo que permite el estudio del microambiente tumoral (de metástasis cerebrales en su caso) con los llamados cultivos organotípicos (COT). Este sistema consiste en poner en cultivo cortes enteros y semi-gruesos (250 μm) del tejido tumoral. Estos cortes se realizan en un vibrátomo previa inclusión del tejido en un molde de agarosa al 4%. A continuación, los cortes se colocan por encima de una membrana flotante en el medio de cultivo generando de esta manera una interfaz aire-líquido que permite la difusión del O_2 desde arriba y del medio desde abajo, similar a los cultivos ALIOs (fig. 37). La ventaja de esta técnica radica en que no es necesario manipular y cortar el tejido ni suspenderlo en una matriz artificial como el colágeno. Tras una fase de optimización del protocolo para adaptarlo a los requerimientos del tejido hepático, se confirmó que la arquitectura tisular se mantenía más intacta que en el caso de los ALIOs (fig. 38a). Sin embargo, a la hora de tratar los COTs con inmunoterapia, observamos la misma respuesta que con los ALIOs, es decir una muy clara disminución de la viabilidad con el anti-PD-L1 en monoterapia, ninguna respuesta con el galunisertib y una respuesta de la terapia combinada al nivel de la monoterapia con anti-PD-L1 (fig. 38a – b). La inmunofluorescencia del marcador CD3 confirmaba que existía una mayor infiltración por células T en las metástasis tratadas con anti-PD-L1 (aproximadamente el doble) (fig. 38d – e). Asimismo, la ausencia de respuesta en COTs derivados de ratones atímicos (*swiss nude*) confirmaba que el efecto era inmunomediado (fig. 38c).



Figura 37 | Cultivos Organotípicos

Proceso experimental de los cultivos organotípicos (COT). Para más detalles, ver texto.

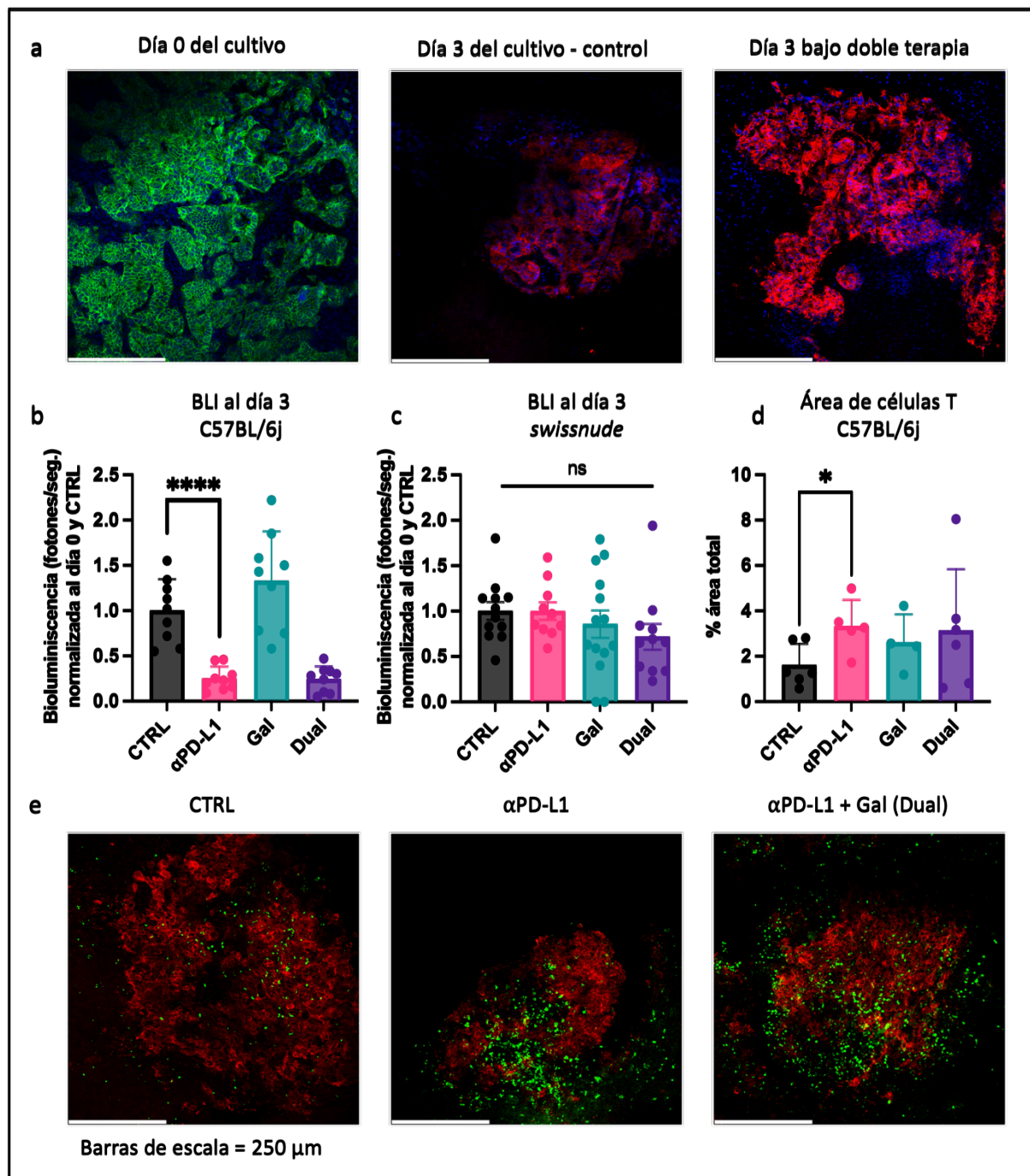


Figura 38 | Efectos de la inmunoterapia sobre los Cultivos Organotípicos

a, Inmunofluorescencia (IF) al día cero (izquierda, verde = Epcam) y al día tres sin tratamiento (medio, rojo = Epcam) y con doble tratamiento (derecha, rojo = Epcam). Azul = DAPI. **b**, Bioluminiscencia al tercer día medida en fotones por segundo, normalizada al día cero y relativa al tratamiento control (CTRL = IgG + vehículo). **** $P < 0,0001$ **c**, Mismo experimento, pero en ratones sin inmunidad adaptativa (*swiss nude*). ns, no significativo. **d**, Análisis del área de células T en porcentaje del área total. Cada punto representa una metástasis. * $P < 0,05$ **e**, Inmunofluorescencia para Epcam (rojo) y CD3 = células T (verde). Se muestra una metástasis representativa para las tres condiciones. Barras de escala, 250 μ m.

3.4. Material & Métodos del Tercer Proyecto

La investigación del tercer proyecto de la tesis ha sido de carácter fundamental. Se realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* con modelos murinos.

3.4.1. Aspectos éticos

Los experimentos con los animales se llevaron cabo en el estabulario del Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona). Se diseñaron los experimentos con el fin de garantizar los principios de las tres “Rs” – Reducción, Refinamiento y Reemplazo – para mejorar el bienestar de los animales. Se cumplió siempre la normativa vigente europea (DIRECTIVA 2010/63/UE) y española (Real Decreto 53/2013) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. La cría, el cuidado y las manipulaciones de los animales fueron siempre efectuados por personal capacitado y acreditado por las autoridades competentes. Los ratones se mantuvieron en una instalación libre de patógenos específicos (SPF) con un ciclo de luz-oscuridad de doce horas y se les dio acceso *ad libitum* a una dieta estándar y agua. Los experimentos estaban contemplados en los procedimientos 9162P1 y 9162P2 aprobados por la Generalitat de Catalunya (Documento M0348). Todos los ratones fueron monitorizados de cerca por el doctorando, técnicos del estabulario y por un científico veterinario independiente responsable del bienestar animal. El doctorando disponía del reconocimiento de las funciones de Cuidado, Eutanasia, Realización de Procedimientos, y Diseño de Proyectos y Procedimientos (funciones a, b, c y d) y realizó los experimentos animales bajo la supervisión de un veterinario. El presente proyecto fue aprobado por parte del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) del IRB con código CEEA-PCB-20-021.

3.4.2. Ratones modificados genéticamente

Para este proyecto se disponía de una colección de diferentes organoides tumorales de primera generación derivados de ratones (MTOs). Esta colección pertenecía al laboratorio de Cáncer Colorrectal (investigador principal: Dr. Eduard Batlle) y los MTOs estaban almacenados en contenedores de nitrógeno líquido a -196 °C los cuales se encontraban en las instalaciones del IRB Barcelona. Los MTOs se habían generado previo al inicio de este proyecto a partir de tumores primarios o metástasis murinos al cruzar ratones C57BL/6j (JANVIER LABS) genéticamente modificados para obtener ratones homocigotos mutantes simples, dobles, triples o cuádruples con diferentes combinaciones de las siguientes mutaciones *driver* del CCR: *Apc*^{fl/fl} (A), *Kras*^{LSL-G12D} (K), *Tgfbr2*^{fl/fl} (T) y *Trp53*^{fl/fl} (P) (85,303). Además, todos los ratones expresaban la proteína fluorescente verde intensificada (eGFP, por sus siglas en inglés) inducible por tamoxifeno como reportero de la presencia de Lgr5 – un marcador de células madre de CCR (*Lgr5*^{eGFP-creERT2} (L) (78,351). Es de destacar que el noventa por ciento de los ratones LAKTP desarrollaron adenocarcinomas invasivos y el cuarenta por ciento desarrolló metástasis en el hígado, el pulmón o una carcinomatosis peritoneal (303). Para el presente proyecto, se utilizaron el MTO129 y el MTO204. Los tumores primarios a partir de los cuales se generaron estos MTOs metastásicos se originaron en el ciego (MTO129) o en el duodeno

(MTO204) de ratones diferentes que compartían las mismas mutaciones *driver*. Las mutaciones en los ratones de origen eran homocigotas para *Tgfbr2* y *Trp53*, y heterocigotas para *Kras* y *Lgr5^{eGFP-creERT2}*. Para el gen *Apc*, los ratones eran heterocigotos en el caso del MTO129, y homocigotos en MTO204.

3.4.3. Cultivos de organoides derivados de ratones (MTOs)

Tras recuperar los MTOs del nitrógeno líquido, se descongelaron rápidamente en un baño a 37 °C, y luego se lavaron y centrifugaron dos veces para eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO) del medio de congelación. Luego, se resuspendieron los MTOs en extracto frío de membrana basal (BME, por sus siglas en inglés) (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, MN, EE. UU., ref. 3532-005-02). Se usó un BME diluido al 66% con medio de cultivo avanzado (AddMEM/F12 + HEPES 10 mM + GlutaMAX 1X [para referencias ver tabla de fungibles]) y se sembraron gotas de 20-30 µL en placas de seis pocillos. Por cada pocillo se sembraron unas veinte gotas de BME lo cual correspondía a aproximadamente 150.000 células. Después de su solidificación en la incubadora durante diez minutos, se añadió medio de cultivo para MTOs, consistente en AddMEM/F12, HEPES 10 mM, GlutaMAX 1X, B27 1:50, Noggin 100 µg/ml, EGF 50 µg/ml y LY2157299 2 µM [ver tabla de fungibles]). Los MTOs se pasaron dos veces por semana para seguir expandiéndolos, o en caso necesario, para repostar el *stock*. Para ello, se disgregaron mecánicamente las gotas de BME y posteriormente se incubaron con tripsina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU., ref. 25200056) durante 5 minutos con el fin de obtener organoides fragmentados, antes de volver a sembrarlos en nuevas gotas de BME al 66%. Para su almacenamiento, se resuspendieron en medio de congelación (45% AddMEM/F12, 45% suero fetal bovino [FBS], 10% DMSO, HEPES 1 mM, GlutaMAX 1X) y se guardaron en el congelador a -80 °C (periodos cortos de tiempo) o en nitrógeno líquido (períodos prolongados).

3.4.4. Generación de metástasis hepáticas en ratones

Se generaron las metástasis hepáticas inyectando diferentes números de células de MTOs en el bazo de ratones singénicos C57BL/6j. En los experimentos se valoró el crecimiento de metástasis tras la inyección de células tumorales individuales obtenidas por digestión completa de los MTOs, en comparación con la inyección en forma de organoides fragmentados (*clusters* de 10-20 células) sin paso previo de digestión enzimática. En el primer caso, se realizó la disgregación incubando los organoides a 37 °C durante 5-10 minutos en Triple (Gibco, ref. 12563011) además de disgregarlos mecánicamente mediante pipeteo hasta obtener células individuales. En el segundo caso, para mantener los organoides intactos, se resuspendieron en una solución salina balanceada de Hank (HBSS, por sus siglas en inglés) dejándolos reposar 20 minutos sobre hielo para así romper el BME previo a su centrifugación. A continuación, se resuspendieron las células individuales o los organoides en HBSS a la concentración deseada y se inyectaron 70 µL por ratón, conteniendo un número variable de células dependiendo del experimento. Después de la inyección de las células, los

ratones se sometieron a esplenectomía total para así evitar el crecimiento tumoral intraesplénico. Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo medidas de asepsia y antisepsia y bajo anestesia general con isoflurano. Al finalizar la cirugía, se cerró la herida con una sutura de la capa muscular y un clip cutáneo, y se administró una sola inyección de buprenorfina por vía subcutánea para conseguir la analgesia. Todos los MTOs estaban equipados con el vector mCherry-luciferasa, lo cual permitió monitorizar el crecimiento metastásico mediante bioluminiscencia tras la inyección de luciferina de forma retroocular (RESEM BV, Lijnden, Países Bajos) y medición de la luz emitida mediante un sistema de imágenes *in vivo* (Xenogen IVIS Spectrum, PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). Al confirmar un crecimiento suficiente de metástasis hepáticas y antes de observar signos de sufrimiento del animal, se sacrificó realizando la eutanasia. Luego, se procedió a la hepatectomía y a la separación de las metástasis del tejido hepático sano (microdissección). Para evitar la contaminación y la desecación del tejido, se lavó con AdDMEM/F12 suplementado con normocina 50 mg/ml y se realizó la microdissección dentro de una campana biológica con flujo laminar y en una placa de Petri con HBSS estéril sobre hielo.

3.4.5. Generación de organoides de segunda generación en interfaz aire-líquido (ALIO)

Para el cultivo con interfaz aire-líquido, se usaron placas multipocillo de seis o doce pocillos en los que se colocaron insertos de cultivo celular que llevaban una membrana de poliéster (PET) transparente con poros de 0,4 μm (Falcon, Corning, New York, EE. UU. ref. 353180; o Millipore, ref. PICM03050). Se añadió 1 ml (6 pocillos) o 330 μL (12 pocillos) de una solución de gel en el fondo de los insertos y se dejó polimerizar a 37 °C durante treinta minutos. En este proyecto se probaron diferentes tipos de soluciones de gel consistentes en una mezcla de una unidad de medio de cultivo estéril concentrado al 10X (DMEM/F-12, Gibco, ref. 12500096), una unidad de tampón de reconstitución estéril (2,2 g de NaHCO_3 en 100 ml de NaOH 0,05 N y HEPES 200 mM) y ocho unidades de una matriz que podría ser colágeno (Cultrex® Rat Collagen I, R&D Systems; o Cellmatrix Type I-A, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Japón) o una mezcla 1:1 de colágeno y BME (Cultrex® Basement Membrane Extract, Type 2, R&D Systems). Tras disgregar mecánicamente el tejido hasta que estuviera casi líquido, se resuspendió en la solución de gel con una ratio de 1:10 y se pipeteó en el inserto por encima de la capa acelular previamente preparada. Se dejó polimerizar en la incubadora a 37 °C durante 30 minutos, y luego se añadió el medio de cultivo. En la primera fase de este proyecto, se probaron diferentes medios de cultivo con el fin de maximizar el crecimiento tumoral y optimizar la viabilidad de todos los componentes del MAT. En los ensayos con tratamiento de los ALIO, el cultivo celular base estaba compuesto por 45% de medio condicionado de WNT, noggin y R-spondin, 45% de AdDMEM/F12 (+ HEPES 1 mM + GlutaMAX 1X), 10% FBS, suplemento B27 a 1:50, nicotinamida 10 mM, n-acetilcisteína 1 mM, EGF 50 $\mu\text{g/ml}$, interleucina-2 recombinante 10 ng/ml y normocina 100 $\mu\text{g/ml}$ (para referencias ver tabla de fungibles). A este medio se le añadió el tratamiento correspondiente según el experimento: IgG 10 $\mu\text{g/ml}$, anti-PD-1 10 $\mu\text{g/ml}$, anti-PD-L1 10 $\mu\text{g/ml}$ o 20 $\mu\text{g/ml}$, galunisertib 5, 20 o 100 μM , anti-CSF-1R 5 $\mu\text{g/ml}$, o combinaciones de ellos (referencias en la

tabla de fungibles). Además, en algunos experimentos se activaron los linfocitos añadiendo anticuerpos anti-CD3e clon 145-2C11 (RUO) a una concentración de 0,5 µg/ml (BD Pharmingen, BD, ref. 557306) y anti-CD28 clon 37.51 a una concentración de 50 ng/ml (BD Pharmingen, ref. 553295) al medio de cultivo.

3.4.6. Producción de medio condicionado por WNT, Noggin y R-Spondin 1 (WNR)

Para generar medio condicionado se usaron células productoras de WNT, R-Spondin 1 y Noggin (L-WRN CRL-3276™, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). Se descongelaron rápidamente las células en un baño de agua a 37 °C, se sembraron con medio precalentado de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, ref. 41966-029) con FBS al 10%, y se incubaron en la incubadora a 37 °C y CO₂ al 5%. Después de 24 horas de incubación, se cambió el medio de cultivo, ahora suplementado con 0,5 mg/ml de G-418 (Promega, Madison, WI, EE. UU., ref. V8091) y 0,5 mg/ml de higromicina B (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ref. 10687010). Cuando las células tenían una confluencia de aproximadamente el 80%, se dividieron en cuatro flascos de 175 ml con 25 ml de medio de cultivo DMEM y FBS al 10%, sin antibióticos. Tras una incubación de entre tres y cuatro días, cuando las células estaban confluentes, se cambió el medio por otras 24 horas y después se empezó a recoger el medio condicionado cada 24 horas hasta un total de cuatro veces. Después de la última recogida, se mezclaron todas las recogidas, se centrifugó el medio condicionado para eliminar restos celulares y se filtró por filtros de 0,22 µm (Millipore, Merck, ref. SLGS033SB). El buen funcionamiento del medio condicionado WNR fue comprobado mediante dos abordajes: primero, organoides de mucosa colónica normal mostraban un rápido crecimiento y buena viabilidad con el medio WNR (+ FBS 10% + EGF 50 µg/ml) mientras que aquellos cultivados con medio basal (solo DMEM + FBS 10% + EGF 50 µg/ml) no eran viables después de siete días de cultivo; segundo, comparado con medio basal, el medio condicionado por WNR indujo claramente la expresión de genes dianas del factor WNT en células HEK293T (3-5X para Axin2 y 1,5-4,5X para EphB3).

3.4.7. Generación de cultivos organotípicos (COT)

Para los cultivos organotípicos, se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 4%. Para ello, se disolvieron 2g de NuSieve™ GTG™ Agarosa (baja fusión) (Lonza, Basilea, Suiza, ref. 50080) en 50 ml de HBSS y se hirvieron tres veces en el microondas, luego se atemperaron a 42 °C en un baño de agua hasta que desaparecieron las burbujas. En una placa de Petri sobre hielo, se separaron los lóbulos hepáticos y se cortaron en dos mitades si eran demasiado grandes para el molde. Se llenaron moldes desechables de 22 x 22 mm (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU., ref. 70182) con agarosa al 4% y se sumergió una pieza de lóbulo hepático portador de metástasis reteniéndolo mediante dos puntas de pipeta hasta que la agarosa empezara a solidificarse. Luego, se incubaron los moldes en hielo hasta que la agarosa se solidificó por completo. A continuación, se liberaron los bloques de agarosa del molde, se recortaron y se fijaron con superpegamento en la parte inferior del portamuestras de un vibrátomo (Leica VT1000S, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania). Se montó el portamuestras

en el vibrátomo, se llenó con HBSS suplementado (HBSS 10X, HEPES pH 7,4 1M, D-Glucosa 1M, CaCl₂ 100 mM, MgCl₂ 100 mM, NaHCO₃ 1 M, penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 µg/ml) y se mantuvo frío poniéndole hielo alrededor. Se cortaron los bloques con una frecuencia de 5, una velocidad de 5 y un espesor de corte de 250 µm. Se recogieron los cortes con un pincel y se colocaron en una placa de Petri con HBSS suplementado. Para el cultivo de los cortes se usaron placas con 24 pocillos llenados cada uno con 500 µL de medio de cultivo (con o sin tratamiento). Se colocaron cuidadosamente las membranas permeables encima del medio asegurándose de que flotaran libremente, pero sin sumergirse en el medio (Whatman® Nucleopore™ Track-Etched Membranes 0,8 µm, Sigma-Aldrich, ref. WHA10417301). Luego, se recogieron los cortes de hígado con dos espátulas y se estiraron cuidadosamente sobre las membranas permeables asegurándose de que estuvieran correctamente expuestos al aire y no sumergidos en el medio para así generar una interfaz aire-líquido.

3.4.8. Bioluminiscencia

Todos los MTOs estaban marcados con el vector mCherry-luciferasa, lo cual permitió analizar el crecimiento metastásico *in vivo*, así como la proliferación de las células epiteliales tumorales de los ALIOs y de los COTs *in vitro* mediante la bioluminiscencia de la proteína luciferina activada por la luciferasa. En los experimentos *in vivo*, se inyectaron 50 µL de luciferina a una concentración de 15 mg/ml en el plexo venoso retroocular (concentración final aproximada de 20 mg/kg). Se realizó este procedimiento bajo anestesia general y local del animal, administrando isoflurano por vía inhalatoria y una gota de un anestésico oftálmico, respectivamente. A los tres a cinco minutos se procedió con la medición de la señal de bioluminiscencia (Xenogen IVIS Spectrum, PerkinElmer). En el caso de los cultivos ALIOs y COTs, se cambió el medio de cultivo por un medio suplementado con luciferina a una concentración de 150 µg/ml 30 minutos antes de la medición. En los experimentos iniciales se objetivó que el pico de señal en los cultivos se alcanzaba entre los 20 y 30 minutos desde la adición de la luciferina. Para la adquisición de los datos se usó el software Living Image® (PerkinElmer, versión 4.5.4) desde donde se exportaron al GraphPad Prism (versión 9) para el análisis estadístico y generación de gráficas.

3.4.9. Histopatología, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

Fijación, inclusión y cortes

Se fijaron los lóbulos hepáticos en formalina durante la noche, y los ALIOs y COTs en paraformaldehído al 4%. En caso de los ALIOs se eliminó el medio de cultivo y se añadió 1 ml de paraformaldehído al pocillo externo y 1 ml al inserto directamente por encima de la matriz en caso de las placas de seis pocillos (en caso de doce pocillos, 330 µL), y se dejó durante cuatro horas en la nevera a 4 °C. En el caso de los COTs, se sumergieron cuidadosamente los cortes de tejido en el medio, se retiraron las membranas y el medio, se añadieron 500 µL de paraformaldehído al pocillo sumergiendo completamente los cortes y se dejaron durante la

noche en la cámara fría a 4 °C encima de un agitador orbital. Después de su fijación, se lavaron las muestras tres veces con HBSS o D-PBS para eliminar los restos de formalina o paraformaldehído, respectivamente. Se metieron los lóbulos hepáticos en un casete de inclusión para histología. En caso de los ALIOs, se sacaron del inserto, se eliminaron las capas de matriz acelular y se colocaron en microcasetes. Finalmente, se incluyeron los lóbulos hepáticos y ALIOs en parafina y se realizaron cortes de tres μm en un microtomo con rotación semiautomática (Leica RM2255, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) montando los cortes en un portaobjetos. En el caso de los cortes de los COTs (de 250 μm , ya realizados previo a establecer los cultivos), se realizaron las tinciones de inmunofluorescencia con los cortes flotando libremente en los pocillos de la placa de 24 pocillos ('free-floating immunofluorescence', en inglés).

Tinciones

Se usó un sistema automático de tinción (Dako CoverStainer, Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) para desparafinar y teñir los cortes de los lóbulos hepáticos y ALIOs, con el protocolo estándar de hematoxilina (Dako, Agilent, ref. CS70030-2) y eosina (Dako, Agilent, ref. CS70130-2). Para las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias, se utilizaron anticuerpos primarios contra mCherry/tomato (Rockland Immunochemicals, Limerick, PA, EE. UU., ref. 600-401-379) y Epcam (R&D Systems, ref. AF960) para marcar las células tumorales epiteliales, contra CD3 (abcam, ref. ab16669) para marcar linfocitos T, contra CD11b (abcam, ref. ab133357) para marcar macrófagos, contra actina de músculo liso alfa (αSMA) (abcam, ref. ab7817), CD140b (Invitrogen, ref. MA5-14851) o vimentina (abcam, ref. ab92547) para marcar fibroblastos asociados al cáncer, contra Ki67 como marcador de proliferación (BD Pharmingen™, ref. 550609) y contra caspasa escindida-3 como marcador de apoptosis (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU., ref. 9661). Para las inmunofluorescencias se usó además 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Thermo Fisher Scientific, ref. 62248) para teñir los núcleos. Después de incubar con el anticuerpo primario a 4 °C, las muestras fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario que se unía específicamente al anticuerpo primario (ver tabla de fungibles para más detalles). En caso de las inmunohistoquímicas, se conjugó el anticuerpo secundario (anti-Rb HRB, Immunologic, WellMed, Duiven, Países Bajos, ref. DPVR-HRP) con estreptavidina-peroxidasa (Supelco, Merck, ref. S2438). Al añadir peróxido de hidrógeno y diaminobencidina, la peroxidasa libera protones del peróxido de hidrógeno y oxida la diaminobencidina a un producto final marrónáceo. En caso de las inmunofluorescencias, se usaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-conejo IgG Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, ref. A-21206), anti-conejo IgG Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen, ref. A-31573), anti-cabra IgG Alexa Fluor™ 568 (Invitrogen, ref. A-11057), anti-ratón IgG Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen, ref. 31571) y anti-rata IgG Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, ref. A-21208). Se usaron todos los anticuerpos secundarios a una concentración de 1:400. Una vez finalizadas las tinciones, se adquirieron las imágenes de campo claro con un escáner digital equipado con un objetivo 20X (NanoZoomer-2.0 HT C9600, Hamamatsu Photonics, Ciudad de Hamamatsu, Japón). Se visualizaron y analizaron todas las

imágenes con el software NDP.view 2 U123888-01 (Hamamatsu). Todas las imágenes se visualizaron con una corrección gamma establecida en 1,8 para campo claro y 1,0 para inmunofluorescencia.

Las inmunofluorescencias de los cortes de los COTs se realizaron directamente en las placas de 24 pocillos. Tras tres lavados con 500 μ L/pocillo de tampón de lavado (*wash buffer*, en inglés) 'EnVision Flex' 1X (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, ref. K800721) con Tritón X-100 al 0,25% (Sigma-Aldrich, ref. T8787), durante cinco minutos, se bloqueó la reacción de la peroxidasa endógena con 300 μ L/pocillo de *Peroxidase-Blocking Solution* (Dako REAL, ref. S2023) durante 10 minutos y se realizaron otros tres lavados con 500 μ L/pocillo de *wash buffer*-Tritón. Luego, se incubaron con proteínasa K (Agilent, ref. S3020) y, tras otro paso de tres lavados, con 300 μ L/pocillo de suero normal de burro al 10% (NDS, *normal donkey serum*, Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Reino Unido, ref. JAC-017-000-121), caseína al 2% (Thermo Fisher Scientific, ref. 37582) y *wash buffer*-Tritón 0,25% para bloquear la unión a proteínas no específicas. Tras incubación durante dos horas a temperatura ambiente en el agitador orbital, se añadieron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Epcam 1:50 (R&D Systems, ref. AF960), anti-CD3 1:500 (abcam, Cambridge, Reino Unido, ref. ab16669), anti- α SMA 1:200 (abcam, ref. ab7817), anti-caspasa escindida-3 1:100 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU., ref. 9661) y anti-BrDU (5'-bromo-2'-desoxiuridina) 1:100 (abcam, ref. ab6326). Tras incubación durante la noche en la cámara fría a 4 °C sobre el agitador orbital y otros 30 minutos a temperatura ambiente al día siguiente, se realizaron dos lavados con *wash buffer*-Tritón 0,25% y se incubaron con la mezcla de los anticuerpos secundarios a una dilución de 1:400 durante dos horas en el agitador orbital protegido de la luz. Se usaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-conejo IgG Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, ref. A-21206), anti-conejo IgG Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen, ref. A-31573), anti-cabra IgG Alexa Fluor™ 568 (Invitrogen, ref. A-11057), anti-ratón IgG Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen, ref. 31571) y anti-rata IgG Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, ref. A-21208). En caso de anti-CD3, para amplificar su señal, se usó como anticuerpo secundario anti-Rb HRP (Immunologic, ref. DPVR-HRP) junto con tiramida 488 (Alexa Fluor™ 488 Tyramide Reagent, Invitrogen, ref. B40953). Se bloqueó la tiramida con TNT durante 5 minutos (Tris-HCl 1M, NaCl 5M, Tween® 20 [Sigma-Aldrich, ref. P1379]). En caso de anti-BrDU, previo a la incubación con el anticuerpo primario, se incubaron los cortes en 300 μ L/pocillo de ácido clorhídrico 1M durante 20 minutos y luego se lavaron tres veces con *wash buffer*-Tritón 0,25%. Finalmente, se incubaron todos los cortes con DAPI (Thermo Fisher Scientific, ref. 62248) en una dilución de 1:2.000 durante veinte minutos y se hizo un lavado final con *wash buffer*-Tritón 0,25% antes de montar los cortes en un portaobjetos y cubrirlos con un cubreobjetos fijándolo con medio de montaje (Dako Fluorescence Mounting Medium, Agilent, ref. S3023).

3.4.10. Microscopia confocal

Para la adquisición de imágenes de los cortes gruesos de los COTs (grosor de 250 μ m) se utilizó un microscopio confocal con posibilidad de rastrear en tres dimensiones (Laser

Scanning Confocal Microscope Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Se usó un objetivo con aumento de 20X y los siguientes ajustes: ancho de 775 μm , altura de 775 μm , profundidad de -27,12 μm , distancia entre los pasos de 3,01 μm , acumulación de marcos entre 1 y 5, promedio por línea de 2 y potencia de los láseres entre 9 y 20%. Con el software 'Leica Application Suite X', se analizaron las imágenes digitales.

3.4.11. Citometría de flujo

Disociación

Se preparó una solución de células individuales a partir de las metástasis hepáticas el día del sacrificio de los animales y a partir de los ALIOs los días uno, dos y tres de cultivo. Tras el explante del hígado se separaron cuidadosamente las metástasis hepáticas del tejido hepático normal y se cortaron muy finamente. Luego se incubaron en una solución enzimática consistente en DMEM (Gibco, ref. 41966-029), FBS al 2% (Gibco, ref. 26140079), colagenasa IV 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich, ref. C5138), dispasa II 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich, ref. D4693) y Dnasa I 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich, ref. 10104159001) durante 30 minutos en la incubadora a 37 °C. Para completar la disgregación, se pipetearon los restantes agregados celulares varias veces, se pasaron por un colador de células de 100 μm y luego de 40 μm , y se lavaron y centrifugaron con HBSS. Para eliminar los eritrocitos, se trataron con cloruro amónico durante no más de cinco minutos y se hizo otro lavado antes de analizar la concentración celular de una muestra en un dispositivo de conteo automático previa tinción mediante azul de tripano. De las metástasis hepáticas se obtuvieron unos seis millones de células vivas para el análisis citométrico. En caso de los ALIOs, se utilizó la misma solución enzimática para digerir los organoides, pero se suplementó con un inhibidor de la quinasa Rho (Y-27632) (Sigma-Aldrich, ref. SCM075) para evitar al máximo la muerte celular durante el proceso de disociación. Además, para minimizar la muerte celular y maximizar el número de células individuales, se incubaron los ALIOs solo durante veinte minutos con la solución enzimática, pero cada cinco minutos se pasaron por el vórtex (las primeras dos rondas) y se pipetearon varias veces (las últimas dos rondas). Tras cada ronda de cinco minutos de incubación se recogió el sobrenadante con las células individuales flotantes y se transfirió a un nuevo tubo Falcon con solución tamponada (*FACS buffer*) consistente en HBSS y FBS al 5%, y suplementado con el inhibidor de la quinasa Rho. Finalmente, se pasaron las células provenientes de los ALIOs por un colador de 100 μm y luego 40 μm , y se contó la concentración como descrito anteriormente obteniendo entre tres cientos mil y dos millones células vivas. En caso de los ALIOs no se usó cloruro amónico, puesto que ya no contenían eritrocitos.

Tinciones

Primero, para evitar la unión de los anticuerpos marcadores a los receptores Fc se trataron las células con el anticuerpo anti-Mouse CD16/CD32 (Tonbo™, Cytex Biosciences, Fremont, CA, EE. UU., ref. 70-0161) a una dilución de 1:100 en *FACS buffer* durante 10 minutos protegido de la luz. Después se añadió la mezcla de los siguientes anticuerpos y diluciones

(para referencias, ver lista de fungibles): anti-Epcam-BV605 1:300, anti-CD45-PerCP-Cy5 1:500, anti-CD3-PE 1:100, anti-CD11b-BV711 1:200 y anti-CD140b-APC 1:50. Tras incubación durante veinte minutos sobre hielo, se lavaron con solo HBSS para eliminar el FBS y se incubaron con el marcador de viabilidad (LIVE/DEAD™ Fixable Aqua, Molecular Probes by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, ref. L34966) durante ocho minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Tras un lavado con *FACS buffer*, se incubaron con paraformaldehído al 4% durante veinte minutos a temperatura ambiente para fijarlas y se realizaron otros dos lavados con *FACS buffer* antes de analizarlas mediante un citómetro de flujo con cuatro láseres de 405, 488, 561 y 640 nm (BD FACSAria Fusion). Se analizaron los datos citométricos mediante el software FlowJo, versión 10.7.1.

3.4.12. Análisis de expresión

Extracción del ARN

Se extrajeron los ALIOs del inserto, se eliminaron las capas acelulares de la matriz, se añadieron 700 µl de TRIzol (Invitrogen, ref. 12034977) y se trataron con un disruptor tisular hasta que los ALIOs estaban completamente disociados. Después de haberlos dejado cinco minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 µL de cloroformo y se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante incoloro que contenía el ARN y se colocó en un tubo nuevo agregando un volumen de etanol al 70%. Después se pasaron por el vórtex y se pipetearon en una columna para extracción del ARN. Se usó el PureLink™ RNA mini Kit (Thermo Fisher Scientific, ref. 12183025) según las instrucciones del fabricante. Al final del procedimiento, se disolvió el ARN extraído en agua destilada ultrapura libre de ADNasa y ARNasa (Invitrogen, ref. 10977015). Se analizó la calidad del ARN extraído y se midió su concentración mediante un método espectrofotométrico (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Se almacenaron las muestras en el congelador a -80 °C hasta proceder con la síntesis del ADN complementario (cDNA).

Síntesis del ADN complementario

Se usaron 500 ng de ARN para sintetizar el cDNA. Por cada reacción se mezclaron 5 µL de tampón a 10X (Applied Biosystems, ref. 4319981), 5 µL de cebadores aleatorios a 10X (Applied Biosystems, ref. 4319979), 2 µL de deoxinucleósidos trifosfato, 'dNTP' a 25X (Applied Biosystems, ref. 362271), 1 µL de transcriptasa inversa 50 U/µL (Applied Biosystems, ref. 4319983), la cantidad correspondiente de 500 ng de ARN y agua destilada ultrapura libre de ADNasa y ARNasa hasta llegar a 50 µL. Para la reacción en cadena de la polimerasa se usó un termociclador tipo 'SimpliAmp Thermal Cycler' de la marca Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) realizando los siguientes ciclos: diez minutos a 25 °C, dos horas a 37 °C, cinco segundos a 85 °C y finalmente a 16 °C. La concentración de cDNA al final de la síntesis fueron 10 ng/µL los cuales se diluyeron con agua destilada ultrapura para obtener una concentración final de 2 ng/µL. Se guardaron las muestras en el congelador a -20 °C hasta proceder con la PCR cuantitativa.

PCR cuantitativa en tiempo real

Para el análisis de expresión se usaron placas de 96 pocillos. En cada pocillo se mezclaron 3 μ L (equivalente a 6 ng) de cDNA con 7 μ L de la mezcla maestra, la cual consistía en 5 μ L de la mezcla 'Power SYBR™ Green' (Applied Biosystems, ref. 4367659), 1 μ L de la mezcla de los cebadores correspondientes a 5 μ M y 1 μ L de agua destilada ultrapura. Cada condición y cebador se ejecutó en triplicado. Antes de transferir la placa multipocillo al instrumento, esta fue sellada con una película adhesiva transparente para evitar la evaporación y la contaminación entre pocillos (Applied Biosystems, ref. 4306311). Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (q-RT-PCR) en un instrumento StepOnePlus (Applied Biosystems) utilizando una temperatura de hibridación/extensión a 60 °C durante 35 ciclos. Se utilizó el programa de 'Cuantificación – Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct)' con velocidad de rampa estándar (dos horas). Para el primer análisis de los datos crudos se usó el software del instrumento 'Step One', versión v2.3, y luego se exportaron a 'Microsoft Excel', versión 16 para el análisis estadístico, y a 'GraphPad Prism', versión 9 para la generación de gráficas.

Para el análisis de activación linfocítica se usaron los siguientes cebadores cuyas secuencias se obtuvieron de la base de datos en línea <https://www.origene.com/> y se adquirieron a través de Sigma-Aldrich, Merck (<https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>):

<i>Cd3e</i> :	F: GCTCCAGGATTCTCGGAAGTC R: ATGGCTACTGCTGTCAGGTCCA
<i>Cd8a</i> :	F: ACTACCAAGCCAGTGCTGCGAA R: ATCACAGGCGAAGTCCAATCCG
<i>Gzmb</i> (granzima B):	F: CAGGAGAAGACCCAGCAAGTCA R: CTCACAGCTCTAGTCCTCTTGG
<i>Ifng</i> (interferón gamma):	F: CAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGG R: TTTCCGCTTCCTGAGGCTGGAT
<i>Prf1</i> (perforina 1):	F: ACACAGTAGAGTGTCGCATGTAC R: GTGGAGCTGTAAAGTTGCGGG

Como controles endógenos se usaron *Pp1a* y *Tbp* cuyas secuencias se obtuvieron de la base de datos en línea <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> y que se adquirieron en línea a través de Sigma-Aldrich, Merck:

<i>Pp1a</i> (peptidil propil isomerasa A):	F: GAGCTGTTTGCAGACAAAGTTC R: CCCTGGCACATGAATCCTGG
<i>Tbp</i> (proteína de unión a TATA):	F: AGAACAATCCAGACTAGCAGCA R: GGGAACCTCACATCACAGCTC

Tabla 3 | Recursos y fungibles

RECURSO o FUNGIBLE*	MARCA	COMPAÑÍA, SEDE PRINCIPAL	REFERENCIA
LÍNEAS CELULARES			
HEK293T/17	-	ATCC, Manassas, VA, EE. UU.	CRL-11268™
L-WRN	-	ATCC, Manassas, VA, EE. UU.	CRL-3276™
ORGANOIDES			
MTO129	Producción propia		
MTO204	Producción propia		
ANIMALES			
C57BL/6j	-	JANVIER LABS, Saint-Berthevin, Francia	-
Crl:NU(lco)-Foxn1nu ('swiss nude')	-	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, EE. UU.	Código de cepa: 620
MEDIOS DE CULTIVO			
Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham's F12 (AdDMEM/F12)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	12634-010
DMEM/F-12, polvo	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	12500096
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	41966-029
OTROS SUPLEMENTOS			
B27 supplement (retinoic acid free)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	12587-010
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	D8418
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS), no calcium, no magnesium	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	14190-094
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	26140079
GlutaMAX (100x)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	35050-038
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) without Calcium, Magnesium or Phenol Red (10X)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	14185-045
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), without Calcium, Magnesium or Phenol Red (1X)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	10-547F
HEPES 1M (usado a 10 mM)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	15630056
Normal Donkey Serum (NDS)		Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Cambridgeshire, Reino Unido	JAC-017-000-121
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	10977015
Enzimas			
Collagenase type IV from Clostridium histolyticum, 80 mg/ml	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	C5138
Dispase® II, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	D4693

Dnase I, grade II, from bovine pancreas, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	10104159001
Liberase™ TL Research Grade, 50 µg/ml	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	5401020001
MultiScribe Reverse Transcriptase 50 U/µl	Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	4319983
TrypLE™ Select (1X), without phenol red	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	12563011
Trypsin-EDTA (0,25%), phenol red (1X)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	25200056
MATRICES			
Cellmatrix Type I-A (Collagen, Type I, 3 mg/ml, pH 3.0)	-	Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Chuo-Ku, Japan	637-00653
Cultrex Basement Membrane Extract, Type 2, Pathclear (BME)	R&D Systems	Bio-Techne, Minneapolis, MN, EE. UU.	3532-005-02
Cultrex Rat Collagen I, Lower Viscosity	R&D Systems	Bio-Techne, Minneapolis, MN, EE. UU.	3443-100-01
ANTIBIÓTICOS & ANTIFÚNGICOS			
Amphotericin B 250 µg/ml	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	A2942
G-418	-	Promega, Madison, WI, EE. UU.	V8091
Hygromycin B (50 mg/ml)	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	10687010
Normocin™ (50 mg/ml)	-	InvivoGen, Toulouse, Francia	ant-nr-1
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml – 10.000 µg/ml)	Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	15140122
PÉPTIDOS & PROTEINAS			
Recombinant murine IL-2, 20 µg (usado a 10 ng/ml)	PeproTech	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	212-12
Recombinant Human EGF, (usado a 50 µg/ml)	PeproTech	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	AF-100-15
Recombinant Human Noggin (usado a 100 µg/ml)	PeproTech	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	120-10C
Recombinant Human R-Spondin-1 (usado a 25 nM)	Producción propia en colaboración con Dr. Nick Berrow, coordinador de la plataforma de expresión proteica en el IRB Barcelona		
OTRAS MOLÉCULAS			
5-Bromo-2'-deoxyuridine (5-BrDU)	-	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, EE. UU.	HY-15910
D-Luciferin K-salt	-	RESEM BV, Lijnden, Países Bajos	-
LIVE/Dead™ Fixable Aqua - Dead Cell Stain Kit (405 nm)	Molecular Probes by Life Technologies	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	L34966
LY2157299 (Galunisertib) (usado a 2 µM)	Producción propia en colaboración con Dr. Antoni Riera, líder de la “Unidad de Investigación en Síntesis Asimétrica”, IRB Barcelona		
N-Acetyl-L-cysteine 500 mM (usado a 1 mM)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	A7250
Nicotinamide 1M (usado a 10 mM)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	72340
Y-27632 dihydrochloride (Rock inhibitor) (usado a 20 µM)	-	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, EE. UU.	HY-10583
ANTICUERPOS			
anti-alpha smooth muscle Actin	-	abcam, Cambridge, Reino Unido	ab7817
anti-BrDU (5-bromo-2-desoxiuridine)	-	abcam, Cambridge, Reino Unido	ab6326

anti-CD11b	-	abcam, Cambridge, Reino Unido	ab133357
anti-CD140b (PDGFRB Monoclonal Antibody (R.140.4))	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	MA5-14851
anti-CD3	-	abcam, Cambridge, Reino Unido	ab16669
anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175)		Cell Signaling Technology, Danvers, MA	9661
anti-Epcam	R&D Systems	Bio-Techne, Minneapolis, MN	AF960
APC anti-Mouse CD140b Antibody (PDGFRB)	Invitrogen, eBioscience™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	17-1402-82
Biotin-SP (long spacer) AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)		Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Cambridgeshire, Reino Unido	715-065-150
Brilliant Violet 605 anti-Mouse CD326 (Epcam)	-	BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.	118227
Brilliant Violet 711 anti-Mouse / human CD11b	-	BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.	101241
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	A-11057
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	A-31571
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	A-21206
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	A-31573
Donkey anti-Rat IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	A-21208
Goat Anti-Rabbit IgG HRP	Immunologic	WellMed, Duiven, Países Bajos	DPVR-HRP
Normal Mouse IgG	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	12-371
PE anti-mouse CD3 Antibody, clone 17A2 (RUO)	-	BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.	100205
PerCP/Cy5.5 anti-Mouse CD45	-	BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.	103131
Purified Anti-Mouse CD16 / CD32 (Fc Shield) (2.4G2)	Tonbo™	Cytek Biosciences, Fremont, CA, EE. UU.	70-0161
Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody, clone 10F.9G2	-	BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.	124302
Purified anti-mouse CD279 (PD-1) Antibody, clone RMP1-14	-	BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.	114102
Purified anti-mouse CSF1R (CD115) clone AFS98	-	BioXCell, Lebanon, NH, EE. UU.	BE0213
Purified Hamster Anti-Mouse CD28 Clone 37.51	BD Pharmingen™	BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.	553295
Purified Hamster Anti-Mouse CD3e Clone 145-2C11 (RUO)	BD Pharmingen™	BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.	557306
Purified Mouse Anti-Ki-67 Clone B56 (RUO)	BD Pharmingen™	BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.	550609
Recombinant Anti-Vimentin antibody [EPR3776]	-	abcam, Cambridge, Reino Unido	ab92547
OTROS REACTIVOS			

10X RT Buffer	Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	4319981
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	62248
Alexa Fluor™ 488 Tyramide Reagent	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	B40953
Blocker™ Casein in PBS	Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	37582
EnVision FLEX Wash Buffer	Dako	Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.	K800721
Eosin	Dako	Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.	CS70130-2
Hematoxylin	Dako	Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.	CS70030-2
Peroxidase-Blocking Solution	Dako REAL	Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.	S2023
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	4367659
Proteinase K, Ready-to-Use	Dako REAL	Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.	S3020
Streptavidin–Peroxidase Polymer, Ultrasensitive	Supelco	Merck, Darmstadt, Alemania	S2438
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	T8787
TRIzol	Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	12034977
Tween® 20	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	P1379
NUCLEÓTIDOS			
10X RT Random Primers	Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	4319979
dNTP Mix 100 mM	Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	362271
F: GAGCTGTTTGACACAAAGTTC R: CCCTGGCACATGAATCCTGG (PPIA)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	No aplica
F: AGAACAATCCAGACTAGCAGCA R: GGGAACCTCACATCACAGCTC (TBP)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	No aplica
F: GCTCCAGGATTTCTCGGAAGTC R: ATGGCTACTGCTGTCAGGTCCA (CD3e)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	No aplica
F: ACTACCAAGCCAGTGCTGCGAA R: ATCACAGGCGAAGTCCAATCCG (CD8a)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	No aplica
F: CAGGAGAAGACCCAGCAAGTCA R: CTCACAGCTCTAGTCTCTTGG (GZMB)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	No aplica
F: CAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGG R: TTTCCGCTTCTGAGGCTGGAT (IFNG)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	No aplica
F: ACACAGTAGAGTGTCGCATGTAC R: GTGGAGCTGTAAAGTTGCGGG (PRF1)	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	No aplica
KITS COMERCIALES			
PureLink™ RNA mini Kit	Ambion invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	12183025

OTROS FUNGIBLES			
Eukitt® Quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	03989
Falcon® Permeable Support for 12-well Plate with 0.4 µm Transparent PET Membrane	Falcon®	Corning, New York, EE. UU.	353180
MicroAmp™ Clear Adhesive Film	Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	4306311
Millicell Cell Culture Insert, 30 mm, hydrophilic PTFE, 0.4 µm	Millipore	Merck, Darmstadt, Alemania	PICM03050
NuSieve™ GTG™ Agarose (low melting)	-	Lonza, Basilea, Suiza	50080
Peel Away Disposable Embedding Mold Square Shape, 22 x 22 mm	-	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.	70182
Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membranes 0.8 µm	Sigma-Aldrich	Merck, Darmstadt, Alemania	WHA10417301
INSTRUMENTOS			
Amplificador: SimplyAmp Thermal Cycler	Applied Biosystems by Life Technologies	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	-
Bioluminiscencia: Xenogen IVIS-spectrum	-	PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.	-
Citometría de flujo: BD FACSAria Fusion	-	BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.	-
Escaneo digital: NanoZoomer 2.0-HT	-	Hamamatsu Photonics, Ciudad de Hamamatsu, Japón	-
Medición de ácidos nucleicos: NanoDrop 1000 Spectrophotometer	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	-
Microscopía confocal: Leica TCS SP5	-	Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania	-
Microtomo: Leica RM2255 Fully Automated Rotary Microtome	-	Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania	-
PCR en tiempo real: StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems by Life Technologies	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	-
Sistema de tinción automático: Dako CoverStainer	Dako	Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.	-
Vibrátomo: Leica VT1000S	-	Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania	-
SOFTWARE			
FlowJo, versión 10.7.1	-	BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.	-
GraphPad Prism, versión 9	-	San Diego, CA, EE. UU.	-
Leica Application Suite X	-	Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania	-
Living Image, versión 4.5.4	-	PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.	-
Microsoft Excel, versión 16	-	Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.	-
NDP.view 2 U123888-01	-	Hamamatsu Photonics, Ciudad de Hamamatsu, Japón	-
StepOne, versión 2.3	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.	-
*Se han listado todos los productos con sus nombres originales en inglés. Los productos en cada categoría están ordenados alfabéticamente.			

DISCUSIÓN

4.1. Discusión del Primer Proyecto

MicroARNs como Nuevos Biomarcadores para la Progresión Neoplásica en la Colitis Ulcerosa

El primer proyecto de la presente tesis consistió en encontrar y validar nuevos microARNs candidatos como potenciales biomarcadores de la progresión neoplásica en la colitis ulcerosa (CU). El CCR sigue siendo una complicación grave y potencialmente mortal de la colitis ulcerosa de larga evolución; por ello, el cribado y el tratamiento precoz de las lesiones premalignas son determinantes para disminuir su morbimortalidad. Las estrategias de vigilancia actuales apuntan a identificar la displasia mediante colonoscopias periódicas; sin embargo, existen importantes dificultades para detectar y diagnosticar con precisión la displasia, y la colonoscopia sigue siendo un procedimiento invasivo, costoso e incómodo para los pacientes. Por lo tanto, existe una necesidad sustancial de encontrar nuevos biomarcadores que puedan predecir la displasia o el cáncer de forma no invasiva.

Los microARNs representan una parte crucial en la compleja red de regulación epigenética y se han convertido en biomarcadores potenciales para el CCR-CU. Sin embargo, aún existe la necesidad de mejorar el rendimiento diagnóstico y validar los hallazgos. De hecho, ha habido intentos previos de distinguir la neoplasia esporádica de aquella asociada a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) con cierto éxito, pero las observaciones no son consistentes. No es posible diferenciar histológicamente el CCR asociado a la colitis del CCR esporádico. Comúnmente, los estudios han considerado aquellos CCR que desarrollan en un área con inflamación previa conocida como CCR asociado a la colitis (352). Además, el CCR asociado a la colitis a menudo se etiqueta en los biobancos como CCR sin incluir ninguna especificación de su relación con la colitis, lo que dificulta su identificación y diferenciación del CCR esporádico. Abordamos esta limitación en nuestro estudio al incluir como CCR-CU solo aquellos casos que ocurrieron en pacientes con CU de larga evolución conocida y que surgieron en áreas con colitis previa (es decir, quedaría excluido un CCR proximal en un paciente con CU distal de larga duración). Además, para evitar un sesgo de los resultados hacia la inflamación, solo se incluyeron displasias y CCR de pacientes con CU en remisión clínica. Sin embargo, no podemos excluir que exista algún grado de inflamación microscópica en algunas de las muestras, pero estimamos que el impacto en este caso debe haber sido mínimo. Por otro lado, se reclutaron como CCR esporádicos solo aquellos casos diagnosticados a través de un programa de detección de CCR basado en una población de individuos asintomáticos donde los pacientes con EII están específicamente excluidos.

Una de las principales fortalezas de nuestro estudio radica en que refleja la cascada fisiopatológica de la carcinogénesis de la secuencia CCR-CU y CCR esporádico mediante el análisis de muestras de los estados intermedios, es decir, displasia para CCR-CU y adenoma

esporádico para CCR esporádico. Esta aproximación nos ha permitido identificar 64 microARNs diferencialmente desregulados para la secuencia CCR-CU, un resultado comparable con estudios previos (138,197,198,353). Observamos que la mayoría de los microARN estaban desregulados por igual en la secuencia CCR-CU y CCR esporádico. No obstante, algunas especies de microARNs se encontraron desreguladas exclusivamente en la secuencia CCR-CU, por ejemplo, miR-192 infraexpresado y miR-126 sobreexpresado. Estos resultados sugieren que, aunque ambos procesos comparten una amplia gama de características comunes, tienen distintos patrones de expresión de microARNs. También encontramos microARNs asociados al desarrollo de CCR-CU y CCR esporádico, pero en diferentes niveles estadísticamente significativos (por ejemplo, la expresión más elevada de miR-31 en la secuencia CCR-CU). Este hallazgo podría reflejar una relevancia diferente para la carcinogénesis del CCR-CU, causada por una progresión más rápida o un mayor grado de invasión o debido a la inflamación subyacente en esta entidad. Por lo tanto, una fortaleza adicional de este estudio ha sido considerar los niveles significativamente diferentes como uno de los criterios relevantes para la selección de microARNs para la fase de validación.

Los resultados de nuestro estudio también sugieren que los microARNs están vinculados a las diferentes etapas de la carcinogénesis. Por ejemplo, miR-126 y -490 solo se encuentran sobreexpresados en muestras de cáncer y no de displasia, lo que sugiere que son eventos tardíos. En cambio, otros microARNs (por ejemplo, miR-20b, -31 y -106a) parecen ser eventos tempranos porque ya se encuentran sobreexpresados en la displasia, aunque en menor medida que en el cáncer. Nuestra hipótesis es que aquellos microARNs alterados precozmente durante la carcinogénesis y que mantienen o incrementan su desregulación en el cáncer son de mayor interés como biomarcadores, ya que podrían representar un predictor precoz de un mayor riesgo de desarrollar cáncer. En este estudio, el número de muestras de displasia de alto grado no fue suficiente para poder realizar un análisis de subgrupos. Más del 90% de las displasias asociadas a CU se clasificaron como de bajo grado, mientras que el 95% de los adenomas fueron adenomas tubulares con displasia de bajo grado.

Nuestro objetivo principal ha sido identificar microARNs que fueran lo más específico posible para la displasia asociada a la colitis con mayor potencial de progresar a cáncer. Con este fin, hemos aplicado criterios restrictivos que nos permitan identificar biomarcadores de microARN candidatos en muestras de mucosa, que no solo discriminen con precisión la displasia de la mucosa normal, sino que también indiquen un mayor riesgo de CCR y se expresen de manera diferencial en el CCR-CU en comparación con el CCR esporádico. A pesar de lo estricto de esta definición, hemos identificado seis candidatos, tres de los cuales han sido validados positivamente en una cohorte independiente. Los tres microARN validados (es decir, miR-31, -106a y -135b) se habían descrito previamente para varios tipos de cáncer, incluido el CCR, y se habían asociado con diferentes vías cancerígenas, como la señalización RAS para miR-31 (140), y Wnt/b-catenina, PI3K/AKT, TGFBR2 y PTEN para miR-135 (354–357). De particular interés es el miR-31, ya que se había relacionado con el CCR asociado a la EII (138,358). Para el miR-106a, cuyo papel en la proliferación, migración e invasión de células

cancerosas había sido ampliamente descrito para el CCR (359), hemos encontrado en la literatura que además permite distinguir entre enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, así como clasificar la EII indeterminada (360). Ahora, nuestros resultados sugieren un papel novedoso de este microARN también en la carcinogénesis asociada a la EII. Por lo que respecta a miR-135, propuesto como un potencial biomarcador no invasivo en heces para el CCR esporádico y el adenoma avanzado, no había mostrado ningún valor diagnóstico en pacientes con EII hasta el momento, y por lo tanto, su asociación con el CCR-CU también representa un hallazgo verdaderamente novedoso del presente estudio (361).

A pesar de lo prometedor de nuestros resultados, también reconocemos algunas limitaciones de nuestro estudio. Primero, el número de muestras es limitado; aun así, hemos podido identificar biomarcadores candidatos relevantes y validar algunos de ellos. En segundo lugar, el diseño del estudio fue retrospectivo y las muestras en la secuencia CCR-CU se derivaron en su mayoría de diferentes pacientes, lo que no permite inferir causalidad. En tercer lugar, no hemos correlacionado los resultados con los datos clínicos, como el grado de inflamación, el estadio del tumor o la supervivencia libre de enfermedad, porque estos datos no estaban disponibles o el diseño retrospectivo no permitía su uso.

En nuestra opinión, la perspectiva ideal para los microARN como biomarcadores es su utilidad como método de detección no invasivo o mínimamente invasivo en sangre, heces o biopsia rectal para identificar pacientes con una alta probabilidad de tener (o desarrollar) lesiones premalignas o cancerosas. En caso de positividad, se sometería a los pacientes a biopsias o resecciones dirigidas mediante colonoscopia completa para optimizar de este modo la evaluación y estratificación según los perfiles de riesgo individuales y racionalizar mejor las estrategias de vigilancia y tratamiento.

En conclusión, nuestro estudio ha revelado microARNs expresados diferencialmente en la displasia y el CCR-CU. Lo que es más importante, hemos identificado algunos microARNs específicos para el CCR-CU en comparación con el CCR esporádico. Los resultados han sido validados en una cohorte independiente. De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo, así como resultados anteriores, la investigación futura debe centrarse en desarrollar y evaluar paneles de microARNs no invasivos, con el fin de conseguir herramientas de diagnóstico suficientemente robustas, antes de una validación adicional a gran escala en entornos clínicos.

4.2. Discusión del Segundo Proyecto

El Análisis Panepigenómico de la Metilación del ADN en Mucosa Normal Identifica la Hipermetilación del *HLA-F* como un Nuevo Biomarcador Candidato para el Síndrome de Poliposis Serrada

El segundo proyecto de esta tesis tenía como objetivo describir el fenómeno de la metilación aberrante como defecto de campo en mucosa normal de pacientes con Síndrome de Poliposis Serrada (SPS), e identificar biomarcadores que, por un lado, permitan distinguir estos pacientes de los individuos sanos, e identificar aquellos con SPS con mayor riesgo de desarrollar CCR por otro. La patogenia del SPS sigue siendo mayormente desconocida. En este estudio, por primera vez, se ha analizado el perfil de metilación de más de 850.000 CpG en mucosa normal de pacientes con SPS. Los resultados de este proyecto apoyan la existencia de un defecto de campo de metilación en la mucosa normal entre pacientes con SPS e individuos sanos. El hecho de que los niveles de metilación diferencial de algunas CpGs (DMC, por sus siglas en inglés) correlacionen inversamente con los niveles de expresión de su gen correspondiente sugiere que este fenómeno tiene un impacto funcional y, por lo tanto, subraya su relevancia. Finalmente, la hipermetilación de la región intragénica (*gene body*) del gen *HLA-F* en tejido fijado con formalina se validó en una cohorte independiente y en tejido procedente de pólipos serrados, destacándolo como un biomarcador candidato prometedor para el defecto de campo en el SPS.

En un estudio anterior, Minoo y colegas (96) describieron que la hipermetilación del ADN de un panel limitado de los llamados marcadores CIMP era más extensa en pólipos serrados de pacientes con SPS en comparación con pacientes sin criterios para SPS, aunque el número de pacientes (N=3 en el grupo SPS y N=9 en el grupo sin SPS) fue limitado. Esta diferencia se observó de manera más evidente en la mucosa normal del colon proximal. Nuestros resultados, utilizando un análisis de metilación de alto rendimiento, están en línea con esta observación preliminar. Sin embargo, merece especial mención que no se encontraron diferencias significativas en los marcadores CIMP descritos anteriormente en la mucosa colónica normal. En cambio, en el tejido procedente de pólipos serrados, se observó una intensa hipermetilación de los promotores en la mayoría de los marcadores para CIMP descritos anteriormente (*NEUROG1*, *RUNX3*, *CACNA1G*, *MLH1*, *CDKN2A*, *RASSF2* y *MGMT*), sugiriendo que la hipermetilación no acontece en las fases precoces de la enfermedad sino en pólipos serrados ya desarrollados (99,362). Un aspecto interesante de nuestros resultados ha sido observar que, además de las islas CpG en los promotores, los sitios CpG aberrantes en áreas de baja concentración de los mismos (*opensea*) y los sitios CpG ubicados en regiones intragénicas (*gene body*) representaron una proporción significativa de la metilación diferencial observada en la mucosa normal. No obstante, la tecnología utilizada en nuestro estudio únicamente tiene capacidad para capturar el 3% al 4% de aproximadamente 28

millones de sitios CpG en el ADN humano, y se esperan mayores rendimientos con el advenimiento de tecnologías más avanzadas en un futuro cercano.

Nuestra hipótesis partía de que el defecto del campo de metilación en la mucosa normal podría utilizarse potencialmente para identificar pacientes con SPS con mayor riesgo de CCR. Sin embargo, no hemos detectado diferencias significativas en la metilación aberrante entre pacientes con y sin CCR en las dos cohortes independientes analizadas. Dada la heterogeneidad subyacente de la enfermedad, y que el número absoluto de casos con CCR analizado ha sido limitado en ambas cohortes (4 de 50 y 7 de 17, respectivamente), es posible que el análisis de un número mayor de casos de CCR pueda conducir a resultados significativos. Sin embargo, también es posible que aquellas alteraciones necesarias para la formación de pólipos y la progresión a cáncer solo sean detectables en las lesiones desarrolladas y no en la mucosa normal. Esto explicaría la identificación de un número sustancialmente mayor de DMCs en tejido de pólipo directo en comparación con la mucosa de apariencia normal.

En nuestro estudio, la hipermetilación del gen *HLA-F* representa el biomarcador candidato más consistente para el SPS, debido a presentar un mayor número de DMCs, y a que ha sido validado en una cohorte independiente de pacientes y en tejido procedente de pólipos serrados. Además, el gen *HLA-F* se encontró significativamente infraexpresado en la mucosa normal, con una correlación inversa a su estado de metilación. En la literatura, la función del *HLA-F* aún no está completamente descrita, pero está claro que participa en la presentación de péptidos humanos a los receptores de células asesinas naturales y regula la respuesta inmune (363). Además, la expresión del *HLA-F* y otras moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) se ha relacionado con varios cánceres del sistema digestivo en la literatura (364–367), pero la asociación de su estado de metilación con una condición precancerosa como el SPS representa verdaderamente un hallazgo novedoso de nuestro estudio.

García-Solano y colegas (103), en un estudio que comparó el perfil de metilación de adenocarcinomas serrados y tumores con inestabilidad esporádica de microsatélites, encontraron que la hipermetilación del *HLA-DOA* se asociaba a tumores con inestabilidad de microsatélites esporádica, presentando una correlación inversa a sus niveles de expresión. Curiosamente, también encontramos que *HLA-DOA* estaba metilado diferencialmente en tejidos de pólipos serrados (tabla suplementaria S12, ver material *online*: [10.1016/j.jmoldx.2022.03.010](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.03.010)), pero no en la mucosa normal de pacientes con SPS, lo que sugiere que puede ser un evento tardío en la formación de pólipos. Aparte del *HLA-F*, encontramos otras moléculas HLA que estaban diferencialmente metiladas, como el *HLA-DMA* y el *HLA-DPA1* al analizar DMC individuales, así como *HLA-E*, *HLA-J* y *HLA-DPA1* al analizar regiones diferencialmente metiladas (DMR) (tabla suplementaria S6, ver material *online*: [10.1016/j.jmoldx.2022.03.010](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.03.010)). En algunos casos, el estado de hipermetilación se correlacionó con niveles de expresión más bajos. Las moléculas HLA de clase I parecen jugar

un papel importante en la vigilancia inmunológica de las células cancerosas, y nuestro estudio genera la hipótesis de su participación en la iniciación y progresión del cáncer en SPS (368).

Este estudio de nuevo presenta algunas limitaciones. En primer lugar, los resultados no se han validado con una técnica diferente, como pueda ser la pirosecuenciación (103). Sin embargo, se realizó una validación clínica en una cohorte independiente de pacientes utilizando el mismo método, que se considera suficientemente robusto. En segundo lugar, aunque hemos analizado la cohorte más grande hasta ahora de pacientes con SPS por su perfil de metilación en mucosa normal, el número de casos no fue lo suficientemente grande como para realizar un análisis de subgrupos adecuado comparando los criterios I y II de la Organización Mundial de la Salud, o pacientes con y sin CCR. En tercer lugar, con el diseño transversal y comparativo, es imposible realizar una inferencia causal entre el estado de metilación y los niveles de expresión, y la importancia de los genes identificados y la carcinogénesis del SPS. Existe abundante evidencia acerca de la relación entre la hipermetilación de promotores génicos y la reducción de su expresión génica (369). Sin embargo, otros procesos influyen en la expresión génica, como las modificaciones de histonas, los microARN y los ARN largos no codificantes (*lnc-RNA*), que interactúan en una red reguladora compleja (135,370,371). Además, los efectos de la hipermetilación o hipometilación de las regiones intergénicas en la expresión génica son más difíciles de comprender, y es probable que la mayoría de las alteraciones epigenéticas observadas sean eventos pasajeros en lugar de causales (372). Finalmente, este estudio constituye un estudio de prueba de concepto que respalda la existencia de un cierto defecto de campo de metilación en el SPS que necesita ser validado en futuras investigaciones.

En conclusión, en este estudio describimos la existencia de metilación aberrante en la mucosa normal de pacientes con SPS, asociada a cambios en la expresión de los genes afectados. Desde una perspectiva clínica, sería deseable no solo diagnosticar correctamente esta enfermedad, sino también detectar aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar CCR para mejorar los programas de vigilancia y reducir la carga de colonoscopias. Los estudios prospectivos con muestras en serie de mucosa normal, tejido procedente de pólipo y adenocarcinoma serrados pueden proporcionar conocimientos fisiopatológicos más profundos y facilitar el descubrimiento de biomarcadores para el riesgo de cáncer.

4.3. Discusión del Tercer Proyecto

Organoides de Cáncer Colorrectal Cultivados con Interfaz Aire-Líquido para Evaluar la Respuesta a Terapias Dirigidas al Microambiente Tumoral

Los esfuerzos invertidos en la detección y el tratamiento de las lesiones precursoras y las fases precoces del CCR durante los últimos 10-20 años han conseguido disminuir la incidencia y mejorar la supervivencia en esta patología. Sin embargo, un porcentaje significativo de la población diana no participa en los programas de cribado basados en la colonoscopia, por lo que todavía se siguen diagnosticando CCR en fases avanzadas. Así, un reciente estudio pragmático y aleatorizado demostró que la tasa de participación del grupo invitado a someterse a la colonoscopia fue solo del 42% y la reducción de la mortalidad por CCR a los 10 años comparado con el grupo sin cribado no fue significativo (373). Además, estamos viviendo un preocupante auge de esta patología en pacientes jóvenes que (aún) no se incluyen en los programas de cribado por lo que se está esperando un incremento de casos de CCR en estadios más avanzados (4). Al mismo tiempo, los tratamientos para las fases más avanzadas, particularmente la fase metastásica, apenas han conseguido una mejoría de la supervivencia global con respecto a hace 30 años (3). Es cierto que la investigación biomédica durante los últimos 20 años ha identificado numerosas dianas terapéuticas, pero en muchas ocasiones los nuevos fármacos fracasan en demostrar un beneficio para un gran grupo de pacientes. Esto se debe a la gran heterogeneidad molecular entre pacientes por un lado y los mecanismos de resistencia por otro. Dicho de otra manera, los ensayos clínicos aleatorizados necesitan un número suficiente de participantes para llegar a la significancia estadística y concluir que un tratamiento funciona. Pero este número es inalcanzable con terapias altamente personalizadas basándose en múltiples alteraciones moleculares potencialmente susceptibles de farmacoterapia dirigida. Sin embargo, esto no quiere decir que no pueda haber un paciente que sí se beneficia. Además, la complejidad molecular y el creciente número de fármacos dirigidos disponibles complican cada vez más la selección de un tratamiento específico en un paciente determinado. Por estos motivos, se están explorando vías para fundamentar la selección de fármacos en las características singulares de cada paciente y su tumor – un abordaje que se ha llegado a conocer como medicina personalizada. Predecir la respuesta a través del análisis de biomarcadores predictivos es una de las estrategias de este abordaje en uso clínico ya a día de hoy. Sin embargo, su potencia predictiva es claramente insuficiente, puesto que no son capaces de reflejar la complejidad de los cambios moleculares que induciría el tratamiento. Así, aunque un CCR presente inestabilidad de microsatélites y/o pérdida de expresión de los genes de reparación del ADN y presente infiltración por linfocitos, solo un 40% mostrará una respuesta a los IPCIs (290). Por lo tanto, lo ideal sería simular el efecto de un tratamiento sobre un determinado tumor con todas sus características previo a su administración al paciente, similar a los antibiogramas que permiten individualizar los tratamientos antibióticos según la susceptibilidad de la cepa. La idea fundamental es generar una réplica del tumor en pequeño

y evaluar su comportamiento bajo los potenciales tratamientos los cuales pueden incluir incluso agentes aun en investigación. La dificultad de un cáncer, no obstante, es su estructura tridimensional conformada por varios subclones de células epiteliales cancerígenas con diferentes perfiles genotípicos y fenotípicos. Los organoides tumorales generados desde las células epiteliales aisladas de una muestra del cáncer de un paciente modelan esta arquitectura tridimensional y recapitulan parte de la heterogeneidad genómica intratumoral (374). Esta tecnología no solo permite establecer biobancos de muestras vivas de CCR de pacientes, sino también cribar con alto rendimiento una multitud de fármacos y así personalizar el tratamiento (375). En estudios preclínicos, los organoides derivados de pacientes mostraron una alta semejanza genotípica y fenotípica con los tumores originales, identificaron asociaciones entre fármacos y genes y recapitularon *in vitro* la respuesta observada en la clínica (346,375). Sin embargo, estos organoides no son adecuados para el estudio de fármacos que actúan sobre el microambiente tumoral. Para solucionar este problema, existen dos modelos en la actualidad: uno, el modelo de la reconstitución del microambiente tumoral; y dos, el modelo del microambiente tumoral nativo (376). En el primer caso, se disocia completamente una muestra del tumor, se separan las diferentes poblaciones celulares y se crecen organoides tumorales a partir de las células epiteliales. A continuación, se co-cultivan estos con las diferentes células del estroma aisladas previamente del tumor junto o no con células inmunes de una muestra de sangre periférica (377). La obvia desventaja de este modelo es la completa destrucción de la arquitectura tumoral y la artificialidad con la que se reconstituye este en el segundo paso. Al mismo tiempo permite estudiar el efecto de los tratamientos sobre los diferentes tipos de células por separado y descifrar su interacción con las células epiteliales. En el segundo caso, se cultivan esferoides (o *clusters* de células tumorales) tras una digestión ligera, en sistemas microfluídicos los cuales permiten controlar la estructura y rigidez de la matriz, la composición celular, las tasas de flujo del medio en los microvasos y otras características y han sido usados para el estudio del crecimiento tumoral, la extravasación de células cancerosas, la angiogénesis y la respuesta inmunoterapéutica bajo diferentes tratamientos (378). Esta tecnología también se ha llegado a conocer como ‘cáncer-en-un-chip’. Otro modelo, usado en esta tesis y descrito por Neal y colegas (2018), es quizá el que menos manipula la arquitectura y composición celular original del tumor, ya que cultiva directamente pequeños fragmentos tumorales con una interfaz aire-líquido sin previa disociación y reconstitución de sus diferentes poblaciones celulares. En su trabajo, demostraron que los organoides derivados de pacientes no solo recapitulaban la composición del estroma tumoral original sino también el transcriptoma a nivel de células individuales y el repertorio del receptor de célula T dominante. Además, en un modelo murino confirmaron que la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD-1 aplicada a los organoides inducía la apoptosis celular de los organoides a través de la activación y expansión de células T citotóxicas específicas para antígenos tumorales. Por último, confirmaron que se podía observar la misma activación y expansión de células T junto con la apoptosis tumoral en organoides generados a partir de tres cánceres humanos con alta inmunogenicidad: el melanoma, el cáncer de células renales y el adenocarcinoma de pulmón. El objetivo de esta

tesis era reproducir estas observaciones en un modelo murino de CCR menos inmunogénico y más cercano a la realidad. Además, debía incluir no solo IPCIs, sino también ampliarse por fármacos con dianas del microambiente distintas al PD-1 y PD-L1.

4.3.1. Discusión del Modelo

Metástasis hepáticas a partir de la inyección intraesplénica de MTOs

En el estudio de Neal y colegas, se inyectaron de forma singénica y subcutánea en ratones C57Bl/6 células de la línea celular MC38 (Mouse Colon #38) – una línea de adenocarcinoma de colon murino conocida por su alta inmunogenicidad. Así, un estudio reciente demostró mediante secuenciación pan-exómica que esta línea celular contiene más de 2.700 mutaciones no sinónimas, incluyendo mutaciones en *TP53*, *PTEN*, la vía del TGF- β y en *BRAF* el cual está frecuentemente asociado con el fenotipo MSI-H. El perfil mutacional del MC38 mostraba diferentes firmas incluyendo una del déficit del sistema de reparación del ADN (379). Además, este estudio demostró que la inmunoterapia con anti-PD-L1 en ratones que albergaban MC38 subcutáneo potenciaba la immunoedición (379). El modelo que usaron Neal y colegas era, por lo tanto, muy inmunogénico. No obstante, la mayoría de los CCR esporádicos son poco inmunogénicos, por lo que nosotros optamos por un modelo que se caracterizaba por las típicas mutaciones de la secuencia adenoma – carcinoma: mutación del *APC*, *KRAS*, de la vía del TGF- β y del *TP53*. La observación que las metástasis hepáticas perdían rápidamente la infiltración por linfocitos mientras crecían, confirmó que nuestro modelo reflejaba la evasión inmune que se observa frecuentemente en la práctica clínica. Otro motivo a favor de usar este modelo en la presente tesis era que nuestro grupo había demostrado previamente que, aunque presentaba la evasión inmune se podían curar los ratones de las metástasis hepáticas con inmunoterapia cuando se combinaba con el inhibidor del TGF- β galunisertib. El objetivo del presente proyecto era, por lo tanto, analizar si este resultado era reproducible con los ALIOs *in vitro*.

Otra limitación del modelo de Neal y colegas, en mi opinión, era la inyección subcutánea de las células MC38 ya que es muy cuestionable que el microambiente tumoral del CCR quedara correctamente reflejado en los ALIOs. El tejido subcutáneo presenta, sin duda, una composición celular e histológica bien distinta a los sitios metastásicos típicos del CCR. Por eso, en nuestro estudio, con el fin de acercar el modelo más a la realidad biológica, optamos por la inyección intraesplénica de los MTOs para así generar metástasis hepáticas siendo el tipo de metástasis más frecuentemente observado en el CCR. Es cierto que la inyección intraesplénica tampoco es una vía completamente fisiológica ya que ignora la primera parte del proceso metastásico, es decir la infiltración tisular y la invasión vascular que tiene lugar en el tumor primario como paso previo a la extravasación e implantación en el lugar metastásico. Además, requiere la esplenectomía posterior a la inyección quitando por lo tanto un órgano importante del sistema inmune. No obstante, los organoides inyectados en nuestro estudio provenían de metástasis generadas por adenocarcinomas intestinales y presentaban una alta capacidad invasora y metastatizadora en estudios previos, por lo que

teníamos asegurada esta característica (303). Esto se confirmó en el presente proyecto al observar la generación de metástasis hepáticas en prácticamente el cien por cien de las inyecciones intraesplénicas. Por otro lado, el rol del bazo en la inmunidad anticancerígena es muy limitado y la inyección intraesplénica es técnicamente más sencilla y menos sujeta a errores y complicaciones que la inyección intraportal o la implantación ortotópica en el colon (380). Por último, una ventaja relevante de usar organoides frente a las simples líneas celulares consiste en que son estructuras tridimensionales y reflejan un mayor grado de heterogeneidad intratumoral cuando se implantan en el nicho receptor, mientras que las líneas celulares solo presentan un único fenotipo.

4.3.2. Viabilidad y Caracterización de los ALIOs y COTs

A pesar de una gran inversión de tiempo y esfuerzo en optimizar el protocolo en términos de manipulación de las muestras, condiciones estériles y uso de antibióticos, selección y dosis de factores de crecimiento y selección de matrices, resultó muy difícil mantener una buena viabilidad de los ALIOs más allá de los diez a catorce días. El aumento de la señal de bioluminiscencia y las tinciones para Ki67 durante la primera semana de cultivo confirmó que las células tumorales se encontraban en modo proliferativo, pero en las histologías era evidente que los organoides ya presentaban necrosis en su centro. Es cierto que algunos organoides presentaban necrosis central desde el primer día, sobre todo si provenían de metástasis grandes. Por este motivo, intentamos seleccionar metástasis más pequeñas para así evitar poner demasiadas áreas necróticas en cultivo desde el principio. No obstante, era más difícil separar metástasis pequeñas del tejido hepático sano que las metástasis grandes, por lo que los ALIOs contenían restos de hepatocitos en menor o mayor grado. Esto era problemático porque la matriz y el medio no estaban adaptados a las necesidades de los hepatocitos por lo que estos entraban enseguida en apoptosis y contribuían a condiciones de cultivo subóptimas. También pensamos que los ALIOs generados a partir de metástasis pequeñas mostrarían una mejor respuesta a la inmunoterapia, puesto que estaban menos inmunoexcluidas (fig. 33a). Sin embargo, solo observamos una discreta mejoría no significativa en comparación con ALIOs generados a partir de metástasis grandes (fig. 33c). Otro intento para mejorar la viabilidad de los ALIOs consistió en cortar las metástasis en fragmentos muy pequeños siguiendo la idea que los nutrientes del medio difundirían mejor en organoides más pequeños y por lo tanto presentarían menos muerte celular en su centro. De hecho, un estudio con esferoides demostró que aquellos que medían más de 100 – 200 μm ya empezaban a mostrar condiciones hipóxicas en su centro (381). Por eso, Neal y colegas recomendaron en su trabajo fragmentar el tejido hasta que estuviera casi líquido para así conseguir ALIOs lo más pequeños posibles. Sin embargo, para nosotros era evidente que este proceso resultaba en un gran número de células dañadas, por lo que se tenía que encontrar el punto medio entre obtener ALIOs lo suficientemente pequeños y limitar el daño producido por el acto de fragmentación. No obstante, la mayoría de nuestros ALIOs medían claramente más que los 200 μm , por lo que la hipoxia central era prácticamente inevitable sobre todo teniendo en cuenta que los ALIOs crecían durante la primera semana. Comparado con los

ALIOs, los cultivos organotípicos (COTs) presentaban la ventaja de no requerir que el tejido fuera cortado tan intensamente. De hecho, se realizaron cortes de forma muy estandarizada en un vibrátomo. En este aspecto en este estudio favorecemos el uso de los COTs sobre los ALIOs porque las metástasis se mantenían más intactas y mostraban una mejor arquitectura en las histologías. Aún así, los COTs tampoco permitieron un cultivo más allá de los siete a diez días, probablemente debido a su grosor de 250 μm que ya suponía una barrera para la difusión homogénea de medio. No intentamos disminuir este grosor, puesto que ya era difícil la manipulación de estos cortes finos, sobre todo su arrastre por encima de las membranas flotantes sin provocar su rotura o encogimiento. Aunque para la investigación biomédica sería deseable poder cultivar los ALIOs y los COTs de forma más prolongada, para una potencial aplicación clínica quizá no sea tan relevante. Al contrario, en el entorno clínico se busca obtener un resultado sobre un tratamiento candidato a la mayor brevedad posible. En su trabajo, Neal y colegas evaluaron la respuesta a la inmunoterapia a los siete días. Nosotros confirmamos que incluso era posible ver diferencias significativas entre los tratamientos entre el tercer y cuarto día cuando los ALIOs sin tratamiento aún estaban en fase de expansión (fig. 27b). Las muestras humanas presentan la dificultad añadida de contener mayores áreas necróticas, al menos cuando se trata de tumores evolucionados. Para eliminarlas, Neal y colegas pasaron los ALIOs reduciendo en cada pase la cantidad de necrosis, pero al mismo tiempo perdieron parte del microambiente tumoral, lo cual hace dudar de la fiabilidad de los resultados con tratamientos dirigidos hacia el mismo. De cara a una futura aplicación a muestras humanas, el correcto muestreo que evitará partes demasiadas necróticas será crucial, pero no es una tarea fácil. Además, Neal y colegas hicieron hincapié en que el éxito de generar ALIOs desde muestras humanas dependía de muchos factores como el grado de diferenciación, los tratamientos ya recibidos, la técnica de adquisición de muestras, las condiciones iniciales del tejido y el retraso en su procesamiento. Evidentemente, todos estos factores están muy controlados en experimentos animales con organoides basados en líneas celulares o diseñados genéticamente.

Otro aspecto esencial en la utilidad de los ALIOs o COTs para evaluar la respuesta a tratamientos dirigidos al microambiente tumoral es su capacidad de recapitular y preservar el mismo. En nuestro estudio hemos demostrado que los ALIOs preservan la composición de diferentes células del estroma incluyendo fibroblastos, células T y macrófagos sugiriendo que tratamientos dirigidos a estas células podrían tener un efecto sobre el crecimiento o la viabilidad tumoral. No solo confirmamos la presencia de estas células, sino también pudimos verificar que la heterogeneidad que existe entre metástasis en diferentes estados de proliferación e inmunoexclusión del mismo ratón quedaba reflejada en los ALIOs (fig. 25). En su trabajo, Neal y colegas fueron un paso más allá y demostraron que los ALIOs no solo preservaban todos los linajes de células inmunes, sino también identificaron diferentes estados de células B y T mediante la secuenciación simultánea de su ARN (5' RNA-seq) y de sus receptores de células T y B (5' V(D)J-seq), todo ello a nivel de decenas de miles de células individuales. Así demostraron que los dos clonotipos de células T más frecuentes eran

idénticos en una muestra de cáncer renal de células claras y los ALIOs derivados de él, y descubrieron que en ambos se correspondían con células T agotadas. Esto es especialmente digno de mención en que el efecto observado de la inmunoterapia podría provenir de la reactivación de aquellas células agotadas. De hecho, tanto en el estudio de Neal y colegas como en el nuestro, las células T intratumorales eran suficientes para observar una respuesta bajo inmunoterapia. Aún es motivo de debate general si la inmunoterapia dirigida a la vía del PD1/PD-L1 funciona a través del reclutamiento de nuevos clones de células T específicos del tumor o de la reactivación de células T intratumorales (297). En su discusión, Neal y colegas comentan correctamente que es un verdadero desafío descifrar mediante modelos *in vivo* las contribuciones de células inmunes periféricas y de las intratumorales a los efectos de la inmunoterapia. Los ALIOs, en cambio permitirían el estudio de los procesos intratumorales de forma aislada. No obstante, es evidente que la carencia de la (neo)vascularización con perfusión sanguínea y el reclutamiento de células de sangre periférica y desde diferentes sitios extratumorales (como los ganglios linfáticos y la médula ósea) limitan el uso de los ALIOs y de los COTs para el estudio de los efectos de tratamientos que aumentan (o reducen) el número y la actividad de células que *a priori* no se encuentran dentro del tumor. A modo de ejemplo, los ALIOs no sirven para analizar los efectos de los tratamientos anti-VEGF/anti-VEGF-R, ya que las células endoteliales decaen rápidamente en cultivo; y tampoco sirven para la inmunoterapia dirigida al CTLA-4, ya que su ligando está expresado mayoritariamente en la superficie de células T presentes en ganglios linfáticos donde reduce la actividad de estas células cuando entran en contacto con células presentadoras de antígenos (382). En conclusión, es obvio que los ALIOs y los COTs en su diseño actual solo tendrán una utilidad para predecir la respuesta a tratamientos que se dirigen exclusivamente a procesos intratumorales y que no requieren de la participación de células de la periferia. Cabe destacar también que la proporción de diferentes células parece cambiar con el tiempo en cultivo. Así observamos que la proporción de células epiteliales e inmunes cambiaba a favor de las epiteliales ya durante los primeros tres días y que la proporción de macrófagos y células T incluso ya era diferente a favor de los macrófagos después de tan solo 24 horas de cultivo (fig. 34a).

4.3.3. Respuesta a los Tratamientos

Neal y colegas pronosticaron que los ALIOs podrían ser aplicados para estudiar otras inmunoterapias o puntos de control inmunitarios diferentes a la vía PD-1/PD-L1, incluidas las células B, las células asesinas naturales (NK) o los macrófagos, así como inmunoterapias basadas en células. Esto nos motivó a confirmar si los ALIOs podían ser útiles para predecir la respuesta a la inmunoterapia combinada dirigida al anti-PD-L1 y al TGF- β en un modelo de un CCR relativamente poco inmunogénico. En resumen, los estudios previos de nuestro grupo mostraron que los ratones tratados con galunisertib tras inoculación del organoide MTO129 presentaban menor número y volumen de metástasis hepáticas y mayor infiltración y activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ mientras que los tratados con anti-PD-L1 en monoterapia no lo hicieron (303). Los ratones tratados con galunisertib presentaban metástasis

densamente infiltradas por linfocitos CD4+ y CD8+, así como un aumento de la infiltración por células inmunes PD-L1+. El tratamiento combinado con galunisertib y anti-PD-L1 resultó en una reducción considerable del número de metástasis asociado a una prolongación notable de la supervivencia de los ratones (no se alcanzó la mediana de supervivencia tras 400 días de observación). Inesperadamente, los resultados tanto con los ALIOs como con los COTs difirieron sustancialmente de aquellos observados en los experimentos *in vivo*: ambos predecían una respuesta positiva con anti-PD-L1 en monoterapia mientras que el tratamiento con galunisertib no solo no tenía un efecto antitumoral ni siquiera con dosis elevadas, sino que incluso parecía ayudar al crecimiento tumoral, al menos en algunos experimentos. En principio, el galunisertib no debería ejercer un efecto sustancial sobre las células tumorales, ya que estas tenían la vía del TGF- β mutada. El efecto observado con el tratamiento combinado, por otro lado, parecía ser mediado por el efecto del anti-PD-L1. Debemos concluir, por lo tanto, que la capacidad predictiva de los ALIOs es claramente subóptima.

Nuestra primera preocupación con estos resultados fue que el efecto observado con el anti-PD-L1 no fuese mediado por los linfocitos sino un mero efecto tóxicos. Sin embargo, el hecho de que no medimos ningún efecto de los anti-PD-L1 en ALIOs (fig. 30) ni COTs (fig. 38c) provenientes de ratones que carecen de inmunidad adaptativa (*swiss nude*) habla a favor de que estas células eran necesarias para su efecto. No obstante, también es cierto que observamos una infiltración intratumoral por células T muy inferior a la observada en los experimentos *in vivo* y también solo hemos podido confirmar la expresión de algunos, pero no todos de los marcadores de activación linfocítica.

Sobre las posibles razones de la discordancia entre los experimentos *in vivo* con ratones y los experimentos *in vitro* con los ALIOs y COTs solo podemos especular. Dado que se inyectaron los mismos organoides (MTO129) en la misma cepa y género de ratón (masculinos de C57Bl/6j) podemos descartar diferencias genotípicas como una posible fuente de sesgo. Por otro lado, aunque los ALIOs requieran una cierta disociación mecánica de las metástasis con el riesgo de alterar la composición celular del microambiente durante este proceso, parece improbable que esto sea la razón de la discrepancia, ya que observamos los mismos resultados con los COTs. Estos dejaban las metástasis intactas incluso dentro su entorno hepático habitual, al menos dentro del espacio tridimensional de los cortes de 250 μ m de grosor. Una obvia diferencia entre los sistemas *in vitro* y los animales es su ausencia de perfusión sanguínea. Nosotros especulamos que los cultivos sufren un mayor grado de muerte celular inducido por el aporte subóptimo de nutrientes y oxígeno, lo cual podría liberar un mayor número de antígenos tumorales potenciando así la respuesta inmune y como consecuencia siendo efectiva ya bajo monoterapia con anti-PD-L1 sin la necesidad de añadir el galunisertib. En cuanto a los efectos del galunisertib observados *in vivo*, experimentos realizados en nuestro laboratorio (por María Salvany) tras la finalización de esta tesis sugirieron que se debían, al menos en parte, al reclutamiento de linfocitos T activados desde la sangre periférica y no tanto a una expansión de los linfocitos intratumorales. Por lo tanto, no podíamos observar estos efectos con los ALIOs y COTs dada su falta de perfusión

con sangre periférica. La ausencia de respuesta al galunisertib y la ausencia del efecto potenciador del galunisertib en los ALIOs y COTs también podrían explicarse por su acción sobre otras células, los fibroblastos, por ejemplo, para los que las condiciones de cultivo aún no están adaptadas óptimamente. Aunque Neal y colegas hayan demostrado una buena preservación de varios subtipos y estados de múltiples células del MAT, no se puede descartar que el entorno artificial de la matriz y la composición del medio de cultivo causen alteraciones, si bien sutiles, en la composición de citoquinas y otras moléculas señalizadoras. El medio de cultivo está optimizado para simular las condiciones del *stem cell niche* y así favorecer el crecimiento tumoral, pero quizá no para la preservación de todas las funciones de las demás células. Neal y colegas ya observaron que la adición de la interleucina-2 al medio de cultivo era necesario para la preservación prolongada de las células T. Las necesidades de las condiciones de cultivo para los fibroblastos, macrófagos y otras células aún son una incógnita. Por último, la falta de perfusión sanguínea y linfática de los ALIOs y COTs también excluye estos no solo de la infiltración por células periféricas, sino también de la afluencia e intercambio de hormonas, factores de crecimiento y otras moléculas señalizadoras de la circulación sistémica. Así es posible que la extracción de las metástasis de su entorno hepático genere un entorno menos inmunosupresor por lo que la inmunoterapia con anti-PD-L1 podría ser efectiva ya sin la adición del galunisertib. Esto estaría en concordancia con la observación de Yu y colegas que el hígado supone un ambiente especialmente inmunosupresor (276). En su estudio, identificaron los macrófagos como potenciales mediadores de este estado inmunosupresor y consiguieron detener el crecimiento de las metástasis hepáticas de la línea inmunogénica MC38 con una combinación de anti-PD-L1 y un tratamiento que depleciona los macrófagos intrahepáticos mientras que el anti-PD-L1 en monoterapia era ineficaz. En nuestro estudio con ALIOs generados a partir de metástasis hepáticas, en cambio, no observamos una mejoría de la respuesta con la adición de un tratamiento dirigido a los macrófagos, pero sí una mejoría significativa con la triple terapia dirigida (al PD-L1, TGF- β y anti-CSF-1R). Para acabar, hay que subrayar que las reflexiones del último párrafo en este momento son meras especulaciones que aún no se han podido estudiar a fondo.

4.3.4. Valoración Global de los Modelos y Futuras Direcciones

Diversos trabajos preclínicos han mostrado el potencial de los organoides derivados de pacientes (PDO, por sus siglas en inglés) para cribar una multitud de fármacos, identificar resistencias y vulnerabilidades moleculares específicas de un tumor e individualizar así las decisiones terapéuticas (346,377,383–388). En un escenario clínico-diagnóstico ideal la información obtenida de los organoides generados partir de biopsias o de muestras de piezas quirúrgicas complementaría el diagnóstico anatomopatológico (es decir: TNM, *grading* e *immunoscore*) y molecular incluyendo datos genómicos (por ejemplo, las variantes patogénicas de *BRAF*^{V600E} y de *KRAS*), epigenómicos (biomarcadores a nivel de metilación de ADN, p. ej., metilación del *MLH1*; modificaciones de histonas y expresión de ARNs no codificantes, p. ej. miR-21), proteómicos (p. ej., la expresión de proteínas del sistema de reparación MMR) y metabolómicos (389). Para ser considerado útil en la práctica clínica,

cualquier herramienta tiene que ser evaluada en términos de tiempo, precisión diagnóstica y estandarización (387). Los datos de estudios clínicos que evalúan estos tres factores aún son muy limitados para los PDOs. En un estudio de Wang y colegas, se evaluó la capacidad de los PDOs para predecir la respuesta a la quimioterapia convencional de CCR en estadio IV. En este estudio ciego, se consiguieron establecer PDOs de muestras humanas en 77 pacientes (80% de los casos) y obtener un resultado dentro de una media de 9 días (rango 7 – 14), lo cual se puede considerar una demora tolerable hasta la administración de la primera dosis del tratamiento en cuestión en el paciente. La sensibilidad, especificidad y precisión para predecir la respuesta fueron 63%, 94% y 80%, respectivamente (390). En otro estudio con esferoides tumorales derivados de 59 pacientes con cáncer gástrico, colorrectal o de mama, se observó una precisión predictiva similar del 93% (387). Es evidente que estos datos prometedores tienen que ser confirmados en ensayos más amplios. La evidencia preclínica para la utilidad de los modelos que intentan modelar el microambiente tumoral es mucho más limitada aun y los ensayos clínicos prácticamente ausentes. Dado su mayor grado de complejidad es dudoso que estos modelos consigan el mismo nivel de precisión para predecir la respuesta a tratamientos dirigidos al MAT. Si bien los estudios pioneros de Neal y colegas y Zhu y colegas supusieron una prueba de concepto para ello y el presente proyecto también confirma la posibilidad de observar efectos inmunomediados, es evidente que aún hay muchas limitaciones a resolver antes de su aplicación en la práctica clínica. En cuanto al factor tiempo, hemos demostrado que un tiempo de cultivo corto puede ser suficiente para evocar una respuesta. Sin embargo, es muy probable que las muestras humanas necesiten más tiempo para establecer los ALIOs no solo porque pueden presentar un crecimiento más lento que los modelos murinos, sobre todo cuando el *grading* es menor, sino también porque puede ser necesario pasar los ALIOs una (o varias) veces antes de aplicar los tratamientos para así eliminar la necrosis intratumoral (ver discusión más arriba). Otro factor limitante que también hay que mejorar aun es la viabilidad de los organoides en cultivo. Como hemos visto antes, la falta de perfusión sanguínea genera un ambiente hostil para los organoides e induce rápidamente la apoptosis o incluso necrosis en ellos falsificando los efectos de las terapias. Para solucionar este problema ya hay varias tecnologías en vías de desarrollo que intentan agregar una red vascular al sistema de cultivo (391). Por ejemplo, un grupo alemán demostró recientemente que la incorporación de células progenitoras mesodérmicas en organoides tumorales resultó en la formación de microvasos dentro de los mismos *in vitro* con la capacidad de conectarse, tras su trasplante, a los vasos de un tejido animal bien vascularizado (392). Otra posibilidad consiste en troquelar la matriz en la que los organoides están incorporados para así formar canales huecos que se siembran con células endoteliales y luego se conectan a sistemas de microperfusión (393). Estas tecnologías podrían permitir generar organoides de mayor tamaño, evitar la necrosis central y cultivarlos durante más tiempo. Este último aspecto es especialmente relevante para su uso en la investigación biomédica ya que el cultivo prolongado podría permitir estudiar los efectos de las terapias o de modificaciones genéticas y epigenéticas a largo plazo. Un modelo alternativo son los chips microfluídicos. Un grupo japonés consiguió generar una red vascular dentro de esferoides tridimensionales que

se conectó con células endoteliales que habían brotado desde los microcanales de un dispositivo microfluídico formando una luz continua. Nashimoto y colegas demostraron que se podían administrar sustancias al interior de los esferoides desde los canales del dispositivo (394). Otra manipulación necesaria para mejorar la fiabilidad del comportamiento de los organoides es su co-cultivo con células periféricas, es decir extratumorales, que podrían ser reclutadas al tumor bajo diferentes tratamientos. Dijkstra y colegas cocultivaron organoides de CCR derivados de humanos con células monocíticas de sangre periférica autólogas y consiguieron demostrar un enriquecimiento de células T citotóxicas reactivas al tumor asociado al asesinato de los organoides autólogos (377). A mi mejor saber, aun no se han intentado cocultivar organoides de segunda generación (ALIOs) con células de sangre periférica. Como los ganglios linfáticos desempeñan un paso esencial en el ciclo de inmunidad antitumoral por su función de presentar antígenos tumorales a las células T, entre otras funciones, cocultivar los ALIOs con células de ganglios linfáticos locoregionales autólogos (tras su resección quirúrgica), podría ser otra medida para seguir perfeccionando el modelo. Por último, la inmunidad del CCR no puede ser comprendida plenamente sin tener en consideración el microbioma. Por esta razón, la futura investigación debería encontrar vías para cocultivar los ALIOs con muestras del microbioma que es singular en cada paciente. Esto será, probablemente, uno de los retos más grandes debido a la complicada tarea de evitar el sobrecrecimiento bacteriano y la contaminación de los cultivos. Para organoides de colon normal ya existen tecnologías para la microinyección de bacterias provenientes de muestras fecales en la luz de los organoides (395). Se ha demostrado que las comunidades de microorganismos sobrevivieron, crecieron y mantuvieron su complejidad incluso ante la presencia de antibióticos para evitar la contaminación de los cultivos (395). Holokai y colegas infectaron organoides gástricos humanos con *Helicobacter pylori* y los cocultivaron con linfocitos T citotóxicos y células dendríticas autólogos del paciente. En su estudio demostraron que la presencia del *H. pylori* inducía la expresión de PD-L1 y que el tratamiento con anti-PD-L1 resultó en la muerte del organoide. Concluyen que las células infectadas con *H. pylori* que expresan PD-L1 pueden estar protegidas de la respuesta inmune, creando lesiones premalignas que podrían progresar a cáncer gástrico (396).

El último párrafo recoge solo algunos de los avances más recientes en el modelamiento del microambiente tumoral y ya pone de manifiesto el creciente nivel de sofisticación y complejidad de estos modelos. De hecho, la presente tesis ya evidencia que el proceso de generar ALIOs y COTs está compuesto por múltiples pasos delicados, de los cuales cada uno está sujeto a posibles fallos e imperfecciones. Por lo tanto, de cara a una futura aplicación clínica será imprescindible estandarizar los procesos y evitar que los protocolos sean demasiado laboriosos. En última instancia también tendrán que sostenerse como una herramienta coste-efectiva, lo cual solo se alcanza si son fiables en su capacidad predictiva y consumen los mínimos recursos posibles.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

El CCR se desarrolla de manera progresiva vía distintas lesiones precancerosas partiendo desde alteraciones moleculares inicialmente invisibles para la endoscopia. Si no se detectan y tratan en fases precoces, las lesiones avanzarán hasta su diseminación metastásica corrompiendo sistemáticamente las células de su microambiente a su favor. Una vez alcanzada esta fase de la enfermedad, el pronóstico sigue siendo nefasto hoy igual que hace 30 años. El cribado poblacional como estrategia de prevención ha demostrado ser efectivo, pero las medidas actuales todavía distan de ser perfectas. Sin embargo, aún existen importantes oportunidades para optimizar la detección precoz del CCR y sus lesiones precursoras. Asimismo, las nuevas terapias con dianas en el microambiente tumoral han generado nueva esperanza, pero aún no disponemos de herramientas adecuadas para predecir su respuesta en un paciente concreto. La presente tesis ha explorado tres nuevas vías diagnósticas para el CCR cubriendo entidades de todo el espectro de su patogenia – desde la mucosa normal, las lesiones serradas, los adenomas esporádicos y la displasia asociada a la colitis hasta la enfermedad metastásica. Las conclusiones de la tesis son:

1. La expresión de microARNs es diferente entre la displasia y el CCR asociado a la colitis. Algunos microARNs muestran un aumento gradual durante la progresión neoplásica en la colitis ulcerosa.
2. Los CCR esporádicos y asociados a CU tienen patrones de expresión de microARNs distintos y algunos de los microARNs son específicos para el CCR asociado a la CU.
3. MiR-31, -106a y -135b han sido validados en una cohorte independiente como posibles biomarcadores en mucosa para la progresión neoplásica en la CU.
4. La investigación futura debe centrarse en desarrollar y evaluar paneles de microARNs no invasivos hasta que sean lo suficientemente sólidos como herramientas de diagnóstico antes de entrar en una validación adicional a gran escala en entornos clínicos.
5. El análisis panepigenómico de metilación del ADN (mediante el *kit* 850K InfiniumEpic BeadChip) es capaz de identificar numerosos dinucleótidos CGs y regiones de CGs diferencialmente metilados (DMC y DMR, respectivamente) en muestras frescas congeladas de mucosa normal de pacientes con SPS. Este resultado refuerza la noción de que existe un defecto de campo en el SPS observado en estudios previos.
6. Se han validado dos genes con DMCs en muestras parafinadas de una cohorte independiente de pacientes con SPS: *HLA-F* y *KLF11*.

7. Siete genes mostraron cambios significativos en sus niveles de expresión, y estos se correlacionaron bien con el estado de metilación de sus CGs correspondientes.
8. Algunos DMCs validados también están presentes en tejido de pólipo serrado junto con cambios epigenéticos adicionales: *HLA-F*, *CDC42SE2*, *RBMS1*, *MUC21*, *PRR12*, *ANK3*, *SNX29*, *TRERF1*, *KLF12* y *AGPAT4*.
9. Hay un enriquecimiento en los cambios de metilación en genes implicados en las vías de señalización del cáncer y la respuesta inmunitaria, pero es necesario dilucidar su posible papel en la carcinogénesis colorrectal.
10. Los resultados de la tesis sugieren que es posible cultivar fragmentos de tumor durante al menos una semana manteniendo al mismo tiempo diferentes células del MAT, incluidos fibroblastos, linfocitos y células mieloides.
11. Los ALIOs son capaces de reflejar la heterogeneidad que se observa entre las distintas metástasis originales de un mismo individuo.
12. Se ha confirmado la factibilidad de inducir y observar respuestas a los inhibidores de los puntos de control inmunitario en los ALIOs y COTs *in vitro*.
13. El hecho de que se observó una respuesta al anti-PD-1 y al anti-PD-L1 a pesar de tratarse de organoides de unos tumores que muestran una rápida inmunoexclusión ha sido un resultado totalmente inesperado y no refleja aquella respuesta observada en los experimentos *in vivo* con estos tratamientos, por lo que su utilidad en este momento es al menos cuestionable. Sin embargo, era evidente que la respuesta era real debido a su reproducibilidad en múltiples experimentos, a la respuesta dosis-efecto y a la ausencia de respuesta en organoides de ratones atímicos.
14. Las importantes limitaciones de los ALIOs son: (1) La técnica es laboriosa y todavía requiere una estandarización antes de ser aplicada a la clínica. (2) Los ALIOs reflejan la heterogeneidad intratumoral, pero esto también puede inducir resultados no consistentes. (3) La viabilidad de los ALIOs sigue siendo un desafío ya que entran rápidamente en apoptosis y necrosis en su centro y esto puede falsificar las respuestas a los tratamientos. (4) Fue difícil obtener muestras de calidad para otros análisis (como la citometría de flujo y la expresión génica). (5) La falta de perfusión sanguínea limita la reproducción de algunos efectos de particular importancia en la respuesta inmunológica.

15. Los COTs, aunque menos laboriosos y con mejor preservación de la arquitectura tisular, tampoco han conseguido recapitular correctamente las respuestas a los tratamientos.
16. Sabiendo sus puntos débiles se pueden seguir desarrollando ambos sistemas de cultivo. La creación de ALIOs vascularizados o su combinación con tecnologías microfluídicas para mejorar su perfusión y viabilidad, y el co-cultivo con células de sangre periférica (y ganglios linfáticos), serán dos puntos claves para superar sus debilidades y acercarlos más a la realidad biológica.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
2. European Commission. ECIS - European Cancer Information System From <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>, accessed on 13/08/2019.
3. NIH National Cancer Institute. SEER - Surveillance, Epidemiology, and End Results Program From <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html> [Internet]. [cited 2021 Nov 17]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7–30.
5. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2343–51.
6. Schmoll HJ, Cartwright T, Tabernero J, Nowacki MP, Figer A, Maroun J, et al. Phase III trial of capecitabine plus oxaliplatin as adjuvant therapy for stage III colon cancer: A planned safety analysis in 1,864 patients. *J Clin Oncol*. 2007 Jan 1;25(1):102–9.
7. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 1;27(19):3109–16.
8. Favoriti P, Carbone G, Greco M, Pirozzi F, Pirozzi REM, Corcione F. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. Vol. 68, *Updates in Surgery*. Springer-Verlag Italia s.r.l.; 2016. p. 7–11.
9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759–67.
10. Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA. Population-Based Family History–Specific Risks for Colorectal Cancer: A Constellation Approach. *Gastroenterology*. 2010 Mar;138(3):877–85.
11. Butterworth AS, Higgins JPT, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2006 Jan;42(2):216–27.
12. Kastrinos F, Samadder NJ, Burt RW. Use of Family History and Genetic Testing to Determine Risk of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020 Jan 1;158(2):389–403.
13. Win AKO, Jenkins MA, Buchanan DD, Clendenning M, Young JP, Giles GG, et al. Determining the frequency of de novo germline mutations in DNA mismatch repair genes. *J Med Genet*. 2011 Aug;48(8):530–4.

14. Rofes P, González S, Navarro M, Moreno-Cabrera JM, Solanes A, Darder E, et al. Paired Somatic-Germline Testing of 15 Polyposis and Colorectal Cancer-Predisposing Genes Highlights the Role of APC Mosaicism in de Novo Familial Adenomatous Polyposis. *J Mol Diagn*. 2021 Nov 1;23(11):1452–9.
15. Samadder NJ, Riegert-Johnson D, Boardman L, Rhodes D, Wick M, Okuno S, et al. Comparison of Universal Genetic Testing vs Guideline-Directed Targeted Testing for Patients With Hereditary Cancer Syndrome. *JAMA Oncol*. 2021 Feb 1;7(2):230–7.
16. Samadder NJ, Baffy N, Giridhar K V., Couch FJ, Riegert-Johnson D. Hereditary Cancer Syndromes-A Primer on Diagnosis and Management, Part 2: Gastrointestinal Cancer Syndromes. *Mayo Clin Proc*. 2019 Jun 1;94(6):1099–116.
17. Chernoff J. The two-hit theory hits 50. Welch M, editor. *Mol Biol Cell*. 2021 Dec 1;32(22).
18. Spoto CPE, Gullo I, Carneiro F, Montgomery EA, Brosens LAA. Hereditary gastrointestinal carcinomas and their precursors: An algorithm for genetic testing. Vol. 35, *Seminars in Diagnostic Pathology*. Semin Diagn Pathol; 2018. p. 170–83.
19. Lorans M, Dow E, Macrae FA, Winship IM, Buchanan DD. Update on Hereditary Colorectal Cancer: Improving the Clinical Utility of Multigene Panel Testing. *Clin Colorectal Cancer*. 2018 Jun 1;17(2):e293–305.
20. de Lima YS, Arnau-collell C, Díaz-gay M, Bonjoch L, Franch-expósito S, Muñoz J, et al. Germline and somatic whole-exome sequencing identifies new candidate genes involved in familial predisposition to serrated polyposis syndrome. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 2;13(4):1–21.
21. Murphy A, Solomons J, Risby P, Gabriel J, Bedenham T, Johnson M, et al. Germline variant testing in serrated polyposis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. 2022 May 1;37(5):861–9.
22. Coletta AM, Peterson SK, Gatus LA, Krause KJ, Schembre SM, Gilchrist SC, et al. Energy balance related lifestyle factors and risk of endometrial and colorectal cancer among individuals with lynch syndrome: a systematic review. *Fam Cancer*. 2019 Oct 1;18(4):399–420.
23. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol*. 2017 Aug 1;28(8):1788–802.
24. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015 Feb 3;112(3):580–93.
25. Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Mons U, Jenab M, Freisling H, Bueno-de-Mesquita B, et al. Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med*. 2016 Dec 5;14(1):62.

26. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi F El, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*. 2015 Dec 1;16(16):1599–600.
27. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med*. 2016 Dec 22;14(1):21.
28. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2016 Aug 25;375(8):794–8.
29. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Oct 17;104(20):1548–61.
30. Stewénus J, Adnerhill I, Anderson H, Ekelund GR, Florén CH, Fork FT, et al. Incidence of colorectal cancer and all cause mortality in non-selected patients with ulcerative colitis and indeterminate colitis in Malmö, Sweden. *Int J Colorectal Dis*. 1995;10(2):117–22.
31. Manninen P, Karvonen A-L, Huhtala H, Aitola P, Hyöty M, Nieminen I, et al. The risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel diseases in Finland: a follow-up of 20 years. *J Crohns Colitis*. 2013 Dec;7(11):e551-7.
32. Lutgens MWMD, van Oijen MGH, van der Heijden GJMG, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(4):789–99.
33. Fumery M, Dulai PS, Gupta S, Prokop LJ, Ramamoorthy S, Sandborn WJ, et al. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis With Low-Grade Dysplasia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017 May 1;15(5):665-674.e5.
34. Bopanna S, Ananthakrishnan AN, Kedia S, Yajnik V, Ahuja V. Risk of colorectal cancer in Asian patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 Apr 1;2(4):269–76.
35. Wandall EP, Damkier P, Møller Pedersen F, Wilson B, Schaffalitzky de Muckadell OB. Survival and incidence of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis in Funen county diagnosed between 1973 and 1993. *Scand J Gastroenterol*. 2000 Mar;35(3):312–7.
36. Castaño-Milla C, Chaparro M, Gisbert JP. Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 Apr;39(7):645–59.
37. Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT, Pedersen BV, Nielsen NM, Frisch M. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology*. 2012 Aug;143(2):375-81.e1; quiz e13-4.
38. Beaugerie L, Svrcek M, Seksik P, Bouvier A-M, Simon T, Allez M, et al. Risk of colorectal

- high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013 Jul;145(1):166-175.e8.
39. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*. 2007 Oct;133(4):1099–105; quiz 1340–1.
 40. Colman RJ, Rubin DT. Histological inflammation increases the risk of colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a systematic review. *Intest Res*. 2016 Jul;14(3):202–10.
 41. Nieminen U, Jussila A, Nordling S, Mustonen H, Färkkilä MA. Inflammation and disease duration have a cumulative effect on the risk of dysplasia and carcinoma in IBD: a case-control observational study based on registry data. *Int J cancer*. 2014 Jan 1;134(1):189–96.
 42. Korelitz BI, Sultan K, Kothari M, Arapos L, Schneider J, Panagopoulos G. Histological healing favors lower risk of colon carcinoma in extensive ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2014 May 7;20(17):4980–6.
 43. Zheng HH, Jiang XL. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease: a meta-analysis of 16 observational studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Mar 4;28(4):383–90.
 44. Söderlund S, Brandt L, Lapidus A, Karlén P, Broström O, Löfberg R, et al. Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2009 May;136(5):1561–7; quiz 1818–9.
 45. Rosty C, Brosens LAA, Dekker E, Nagtegaal ID. Serrated Polyposis. 5th ed. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive System Tumours. WHO Classification of Tumours series., editor. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: World Health Organization; 2019.
 46. Williams GT, Arthur JF, Bussey HJ, Morson BC. Metaplastic polyps and polyposis of the colorectum. *Histopathology*. 1980 Mar;4(2):155–70.
 47. Jørgensen H, Mogensen AM, Svendsen LB. Hyperplastic polyposis of the large bowel. Three cases and a review of the literature. *Scand J Gastroenterol*. 1996 Aug;31(8):825–30.
 48. IJspeert JEG, Bevan R, Senore C, Kaminski MF, Kuipers EJ, Mroz A, et al. Detection rate of serrated polyps and serrated polyposis syndrome in colorectal cancer screening cohorts: a European overview. *Gut*. 2017 Jul;66(7):1225–32.
 49. Rivero-Sanchez L, Lopez-Ceron M, Carballal S, Moreira L, Bessa X, Serradesanferm A, et al. Reassessment colonoscopy to diagnose serrated polyposis syndrome in a colorectal cancer screening population. *Endoscopy*. 2017 Jan 14;49(1):44–53.
 50. Boparai KS, Mathus-Vliegen EMH, Koornstra JJ, Nagengast FM, van Leerdam M, van Noesel CJM, et al. Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: a multicentre cohort study. *Gut*. 2010 Aug;59(8):1094–100.

51. Bleijenberg AGC, Ijspeert JEG, Hazewinkel Y, Boparai KS, Oppeneer SC, Bastiaansen BAJ, et al. The long-term outcomes and natural disease course of serrated polyposis syndrome: over 10 years of prospective follow-up in a specialized center. *Gastrointest Endosc.* 2020 Nov 30;92(5):1098-1107.e1.
52. Carballal S, Rodríguez-Alcalde D, Moreira L, Hernández L, Rodríguez L, Rodríguez-Moranta F, et al. Colorectal cancer risk factors in patients with serrated polyposis syndrome: A large multicentre study. *Gut.* 2016 Nov;65(11):1829–37.
53. Bleijenberg AGGC, Ijspeert JEEG, van Herwaarden YJ, Carballal S, Pellisé M, Jung G, et al. Personalised surveillance for serrated polyposis syndrome: results from a prospective 5-year international cohort study. *Gut.* 2020 Jan 13;69(1):112–21.
54. Quintana I, Mejías-Luque R, Terradas M, Navarro M, Piñol V, Mur P, et al. Evidence suggests that germline RNF43 mutations are a rare cause of serrated polyposis. *Gut.* 2018 Dec 1;67(12):2230–2.
55. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol.* 2012 Sep 19;107(9):1315–29; quiz 1314, 1330.
56. Rosty C, Hewett DG, Brown IS, Leggett BA, Whitehall VLJ. Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management. *J Gastroenterol.* 2013 Mar 4;48(3):287–302.
57. He EY, Wyld L, Sloane MA, Canfell K, Ward RL. The molecular characteristics of colonic neoplasms in serrated polyposis: a systematic review and meta-analysis. *J Pathol Clin Res.* 2016 Jul;2(3):127–37.
58. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014 Mar 14;20(10):2634–40.
59. Boparai KS, Reitsma JB, Lemmens V, van Os TAM, Mathus-Vliegen EMH, Koornstra JJ, et al. Increased colorectal cancer risk in first-degree relatives of patients with hyperplastic polyposis syndrome. *Gut.* 2010 Sep 1;59(9):1222–5.
60. Win AK, Walters RJ, Buchanan DD, Jenkins MA, Sweet K, Frankel WL, et al. Cancer risks for relatives of patients with serrated polyposis. *Am J Gastroenterol.* 2012 May 24;107(5):770–8.
61. Egoavil C, Juárez M, Guarinos C, Rodríguez-Soler M, Hernández-Illán E, Alenda C, et al. Increased Risk of Colorectal Cancer in Patients With Multiple Serrated Polyps and Their First-Degree Relatives. *Gastroenterology.* 2017 Jul;153(1):106-112.e2.
62. Oquiñena S, Guerra A, Pueyo A, Eguaras J, Montes M, Razquin S, et al. Serrated polyposis: prospective study of first-degree relatives. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jan;25(1):28–32.
63. Hazewinkel Y, Koornstra J-J, Boparai KS, van Os TAM, Tytgat KMAJ, Van Eeden S, et al. Yield of screening colonoscopy in first-degree relatives of patients with serrated polyposis syndrome. *J Clin Gastroenterol.* 2015;49(5):407–12.

64. Shrubsole MJ, Wu H, Ness RM, Shyr Y, Smalley WE, Zheng W. Alcohol Drinking, Cigarette Smoking, and Risk of Colorectal Adenomatous and Hyperplastic Polyps. *Am J Epidemiol.* 2008 Feb 27;167(9):1050–8.
65. Fu Z, Shrubsole MJ, Smalley WE, Wu H, Chen Z, Shyr Y, et al. Lifestyle Factors and Their Combined Impact on the Risk of Colorectal Polyps. *Am J Epidemiol.* 2012 Nov 1;176(9):766–76.
66. Lee JY, Chang H-S, Kim TH, Chung EJ, Park HW, Lee J-S, et al. Association Between Cigarette Smoking and Alcohol Consumption and Sessile Serrated Polyps in Subjects 30 to 49 Years Old. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jul 1;17(8):1551-1560.e1.
67. IJspeert J, Bossuyt P, Kuipers E, Stegeman I, de Wijkerslooth T, Stoop E, et al. Smoking status informs about the risk of advanced serrated polyps in a screening population. *Endosc Int open.* 2016 Nov 27;4(1):E73–8.
68. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. Vol. 20, *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* Annual Reviews Inc.; 2004. p. 695–723.
69. Vasquez EG, Nasreddin N, Valbuena GN, Mulholland EJ, Belnoue-Davis HL, Eggington HR, et al. Dynamic and adaptive cancer stem cell population admixture in colorectal neoplasia. *Cell Stem Cell.* 2022 Aug 4;29(8):1213-1228.e8.
70. de Sousa E Melo F, de Sauvage FJ. Cellular Plasticity in Intestinal Homeostasis and Disease. *Cell Stem Cell.* 2019 Jan 3;24(1):54–64.
71. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007 Jan;50(1):113–30.
72. Niida A, Mimori K, Shibata T, Miyano S. Modeling colorectal cancer evolution. *J Hum Genet.* 2021 Sep 1;66(9):869–78.
73. Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Hirata H, Sugimachi K, et al. Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet.* 2016 Feb 1;12(2):e1005778.
74. Lu Y-W, Zhang H-F, Liang R, Xie Z-R, Luo H-Y, Zeng Y-J, et al. Colorectal Cancer Genetic Heterogeneity Delineated by Multi-Region Sequencing. *PLoS One.* 2016 Mar 1;11(3):e0152673.
75. Wei Q, Ye Z, Zhong X, Li L, Wang C, Myers RE, et al. Multiregion whole-exome sequencing of matched primary and metastatic tumors revealed genomic heterogeneity and suggested polyclonal seeding in colorectal cancer metastasis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017 Sep 1;28(9):2135–41.
76. Barker N, Ridgway RA, Van Es JH, Van De Wetering M, Begthel H, Van Den Born M, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* 2009 Jan 29;457(7229):608–11.
77. Merlos-Suárez A, Barriga FM, Jung P, Iglesias M, Céspedes MV, Rossell D, et al. The

- intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell*. 2011 May 6;8(5):511–24.
78. De Sousa E Melo F, Kurtova A V., Harnoss JM, Kljavin N, Hoeck JD, Hung J, et al. A distinct role for Lgr5 + stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature*. 2017 Mar 29;543(7647):676–80.
 79. Iyer DN, Sin W-Y, Ng L. Linking stemness with colorectal cancer initiation, progression, and therapy. *World J Stem Cells*. 2019 Aug 26;11(8):519–34.
 80. Martínez-Jiménez F, Muiños F, Sentís I, Deu-Pons J, Reyes-Salazar I, Arnedo-Pac C, et al. A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat Rev Cancer*. 2020 Oct 10;20(10):555–72.
 81. Jungwirth J, Urbanova M, Boot A, Hosek P, Bendova P, Siskova A, et al. Mutational analysis of driver genes defines the colorectal adenoma: in situ carcinoma transition. *Sci Rep*. 2022 Feb 16;12(1):2570.
 82. Markowitz SD, Bertagnolli MM, Purnak T, Ozaslan E, Efe C, Markowitz SD, et al. Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2010 Dec 17;361(13):2449–60.
 83. Sievers CK, Grady WM, Halberg RB, Pickhardt PJ. New insights into the earliest stages of colorectal tumorigenesis. Vol. 11, *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. NIH Public Access; 2017. p. 723–9.
 84. Jones S, Chen WD, Parmigiani G, Diehl F, Beerenwinkel N, Antal T, et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 18;105(11):4283–8.
 85. Fumagalli A, Drost J, Suijkerbuijk SJEE, van Boxtel R, de Ligt J, Offerhaus GJ, et al. Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids. *Proc Natl Acad Sci*. 2017 Mar 21;114(12):E2357–64.
 86. Sakai E, Nakayama M, Oshima H, Kouyama Y, Niida A, Fujii S, et al. Combined Mutation of Apc, Kras , and Tgfbr2 Effectively Drives Metastasis of Intestinal Cancer. *Cancer Res*. 2018 Mar 1;78(5):1334–46.
 87. Jass JR, Iino H, Ruzsiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ, et al. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut*. 2000 Jul;47(1):43–9.
 88. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2088–100.
 89. De Palma FDE, D’Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Jul 20;11(7):1017.
 90. Tateyama H, Li W, Takahashi E, Miura Y, Sugiura H, Eimoto T. Apoptosis Index and Apoptosis-Related Antigen Expression in Serrated Adenoma of the Colorectum. *Am J Surg Pathol*. 2002 Feb;26(2):249–56.

91. Gala MK, Mizukami Y, Le LP, Moriichi K, Austin T, Yamamoto M, et al. Germline Mutations in Oncogene-Induced Senescence Pathways Are Associated With Multiple Sessile Serrated Adenomas. *Gastroenterology*. 2014 Feb;146(2):520-529.e6.
92. Kaji E, Suzuki H, Uraoka T, Tanaka T, Kato J, Akita M, et al. Externalization of saw-tooth architecture in small serrated polyps implies the presence of methylation of IGFBP7. *Dig Dis Sci*. 2012 May;57(5):1261–70.
93. Kriegl L, Neumann J, Vieth M, Greten FR, Reu S, Jung A, et al. Up and downregulation of p16 Ink4a expression in BRAF-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer. *Mod Pathol*. 2011 Jul;24(7):1015–22.
94. Herreros de Tejada A, González-Lois C, Santiago J. Serrated lesions and serrated polyposis syndrome. *Rev Esp enfermedades Dig*. 2017 Jul;109(7):516–26.
95. Renaud F, Mariette C, Vincent A, Wacrenier A, Maunoury V, Leclerc J, et al. The serrated neoplasia pathway of colorectal tumors: Identification of MUC5AC hypomethylation as an early marker of polyps with malignant potential. *Int J Cancer*. 2016 Mar 15;138(6):1472–81.
96. Minoo P, Baker K, Goswami R, Chong G, Foulkes WD, Ruzskiewicz AR, et al. Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis. *Gut*. 2006 Oct 1;55(10):1467–74.
97. Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Dec 6;98(23):1731–8.
98. Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ. BRAF and KRAS mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: Relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol*. 2004 Nov;28(11):1452–9.
99. Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics*. 2016;8(1):25.
100. Tsai JH, Liao JY, Lin YL, Lin LI, Cheng YC, Cheng ML, et al. Traditional serrated adenoma has two pathways of neoplastic progression that are distinct from the sessile serrated pathway of colorectal carcinogenesis. *Mod Pathol*. 2014 Oct 1;27(10):1375–85.
101. García-Solano J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuela-Fuentes P, et al. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: Further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2010 Oct;41(10):1359–68.
102. Conesa-Zamora P, García-Solano J, Turpin M del C, Sebastián-León P, Torres-Moreno D, Estrada E, et al. Methylome profiling reveals functions and genes which are differentially methylated in serrated compared to conventional colorectal carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2015 Dec 17;7(1):101.

103. García-Solano J, Turpin MC, Torres-Moreno D, Huertas-López F, Tuomisto A, Mäkinen MJ, et al. Two histologically colorectal carcinomas subsets from the serrated pathway show different methylome signatures and diagnostic biomarkers. *Clin Epigenetics*. 2018 Dec 9;10(1):141.
104. Porter RJ, Arends MJ, Churchhouse AMD, Din S. Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer: Translational Risks from Mechanisms to Medicines. *J Crohns Colitis*. 2021 Dec 18;15(12):2131–41.
105. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. 2013 Nov 1;7(10):827–51.
106. Ullman T, Croog V, Harpaz N, Hossain S, Kornbluth A, Bodian C, et al. Progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: effect of mesalamine. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Nov;6(11):1225–30.
107. Choi CHR, Rutter MD, Askari A, Lee GH, Warusavitarne J, Moorghe M, et al. Forty-Year Analysis of Colonoscopic Surveillance Program for Neoplasia in Ulcerative Colitis: An Updated Overview. *Am J Gastroenterol*. 2015 Jul 8;110(7):1022–34.
108. Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, Carballal-Ramil S, Cubiella-Fernández J, Ferrándiz-Santos J, et al. Guía de práctica clínica - Diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal. Asociación Española de Gastroenterología y Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria; 2018.
109. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. *J Crohn's Colitis*. 2017 Jun 1;11(6):649–70.
110. Van Schaik FDM, Ten Kate FJW, Offerhaus GJA, Schipper MEI, Vleggaar FP, Van Der Woude CJ, et al. Misclassification of dysplasia in patients with inflammatory bowel disease: Consequences for progression rates to advanced neoplasia. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 May;17(5):1108–16.
111. Carballal S, Maisterra S, López-Serrano A, Gimeno-García AZ, Vera MI, Marín-Garbriel JC, et al. Real-life chromoendoscopy for neoplasia detection and characterisation in long-standing IBD. *Gut*. 2018 Jan 1;67(1):70–8.
112. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers complicating inflammatory bowel disease. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2015 Apr 9;372(15):1441–52.
113. Rubin CE, Haggitt RC, Burmer GC, Brentnall TA, Stevens AC, Levine DS, et al. DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1992 Nov;103(5):1611–20.
114. Galandiuk S, Rodriguez-Justo M, Jeffery R, Nicholson AM, Cheng Y, Oukrif D, et al. Field cancerization in the intestinal epithelium of patients with Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):855-864.e8.

115. Yaeger R, Shah MA, Miller VA, Kelsen JR, Wang K, Heins ZJ, et al. Genomic Alterations Observed in Colitis-Associated Cancers Are Distinct From Those Found in Sporadic Colorectal Cancers and Vary by Type of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2016 Aug 1;151(2):278-287.e6.
116. Modesto R, Estarreja J, Silva I, Rocha J, Pinto R, Mateus V. Chemically Induced Colitis-Associated Cancer Models in Rodents for Pharmacological Modulation: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2022 May 12;11(10):2739.
117. Pereira C, Coelho R, Grácio D, Dias C, Silva M, Peixoto A, et al. DNA Damage and Oxidative DNA Damage in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2016 Nov 1;10(11):1316–23.
118. Wang Z, Li S, Cao Y, Tian X, Zeng R, Liao D-F, et al. Oxidative Stress and Carbonyl Lesions in Ulcerative Colitis and Associated Colorectal Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–15.
119. Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, et al. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res*. 2000 Sep 1;60(17):4864–8.
120. Wanders LK, Cordes M, Voorham Q, Sie D, De Vries SD, D’Haens GRAM, et al. IBD-Associated Dysplastic Lesions Show More Chromosomal Instability Than Sporadic Adenomas. *Inflamm Bowel Dis*. 2020 Jan 6;26(2):167–80.
121. Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Rubin CE, Stevens AC, et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1994 Aug;107(2):369–78.
122. Burmer GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Crispin DA, Brentnall TA, Kolli VR, et al. Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology*. 1992 Nov;103(5):1602–10.
123. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 May 2;6(5):a026062.
124. Robles AI, Traverso G, Zhang M, Roberts NJ, Khan MA, Joseph C, et al. Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology*. 2016 Apr 1;150(4):931–43.
125. Hirano T, Hirayama D, Wagatsuma K, Yamakawa T, Yokoyama Y, Nakase H. Immunological Mechanisms in Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 26;21(9):3062.
126. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. Vol. 8, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med; 2016. p. 227–41.
127. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors.

- Gastroenterology. 2007 Dec;133(6):1869–81.
128. Rafa H, Benkhelifa S, AitYounes S, Saoula H, Belhadeif S, Belkhelfa M, et al. All-Trans Retinoic Acid Modulates TLR4/NF- κ B Signaling Pathway Targeting TNF- α and Nitric Oxide Synthase 2 Expression in Colonic Mucosa during Ulcerative Colitis and Colitis Associated Cancer. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1–16.
 129. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004 Aug 6;118(3):285–96.
 130. Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, Yamamoto M, Tsuruta O, Sata M, et al. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol*. 2010 Feb 1;184(3):1543–51.
 131. Gargalionis AN, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Targeting STAT3 Signaling Pathway in Colorectal Cancer. *Biomedicines*. 2021 Aug 15;9(8):1016.
 132. Knüpfer H, Preiss R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. *Int J Colorectal Dis*. 2010 Feb;25(2):135–40.
 133. Neurath MF. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Feb 1;45:1–8.
 134. Lal G, Ash C, Hay K, Redston M, Kwong E, Hancock B, et al. Suppression of intestinal polyps in Msh2-deficient and non-Msh2-deficient multiple intestinal neoplasia mice by a specific cyclooxygenase-2 inhibitor and by a dual cyclooxygenase-1/2 inhibitor. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6131–6.
 135. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jan 3;17(2):111–30.
 136. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
 137. Bocchetti M, Ferraro MG, Ricciardiello F, Ottaiano A, Luce A, Cossu AM, et al. The Role of microRNAs in Development of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 12;22(8):3967.
 138. Olaru A V., Selaru FM, Mori Y, Vazquez C, David S, Paun B, et al. Dynamic changes in the expression of MicroRNA-31 during inflammatory bowel disease-associated neoplastic transformation. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jan;17(1):221–31.
 139. Wong HKA, Fatimy R El, Onodera C, Wei Z, Yi M, Mohan A, et al. The Cancer Genome Atlas Analysis Predicts MicroRNA for Targeting Cancer Growth and Vascularization in Glioblastoma. *Mol Ther*. 2015 Jul 1;23(7):1234–47.
 140. Sun D, Yu F, Ma Y, Zhao R, Chen X, Zhu J, et al. MicroRNA-31 activates the RAS pathway

- and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *J Biol Chem*. 2013 Mar 29;288(13):9508–18.
141. Manceau G, Imbeaud S, Thiébaud R, Liébaert F, Fontaine K, Rousseau F, et al. Hsa-miR-31-3p expression is linked to progression-free survival in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res*. 2014 Jun 15;20(12):3338–47.
 142. Kang M, Martin A. Microbiome and colorectal cancer: Unraveling host-microbiota interactions in colitis-associated colorectal cancer development. Vol. 32, *Seminars in Immunology*. Semin Immunol; 2017. p. 3–13.
 143. Popov J, Caputi V, Nandeesha N, Rodriguez DA, Pai N. Microbiota-immune interactions in ulcerative colitis and colitis associated cancer and emerging microbiota-based therapies. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 1;22(21):11365.
 144. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014 May;146(6):1489–99.
 145. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998 Dec;115(6):1405–13.
 146. Richard ML, Liguori G, Lamas B, Brandi G, da Costa G, Hoffmann TW, et al. Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer. *Gut Microbes*. 2018 Mar 4;9(2):131–42.
 147. Yu LC-H. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. *J Biomed Sci*. 2018 Nov 9;25(1):79.
 148. Harrer A, Bücker R, Boehm M, Zarzecka U, Tegtmeyer N, Sticht H, et al. *Campylobacter jejuni* enters gut epithelial cells and impairs intestinal barrier function through cleavage of occludin by serine protease HtrA. *Gut Pathog*. 2019 Feb 13;11(1):4.
 149. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis*. 2011 Feb 1;203(3):306–11.
 150. Tan J, Taitz J, Sun SM, Langford L, Ni D, Macia L. Your Regulatory T Cells Are What You Eat: How Diet and Gut Microbiota Affect Regulatory T Cell Development. *Front Nutr*. 2022 Apr 20;9:878382.
 151. Zhang W, An Y, Qin X, Wu X, Wang X, Hou H, et al. Gut Microbiota-Derived Metabolites in Colorectal Cancer: The Bad and the Challenges. *Front Oncol*. 2021 Oct 18;11:739648.
 152. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011 Oct 7;334(6052):105–8.
 153. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan

- 23;505(7484):559–63.
154. Fritsch J, Garces L, Quintero MA, Pignac-Kobinger J, Santander AM, Fernández I, et al. Low-Fat, High-Fiber Diet Reduces Markers of Inflammation and Dysbiosis and Improves Quality of Life in Patients With Ulcerative Colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jun 1;19(6):1189-1199.e30.
 155. Osman M-A, Neoh H-M, Ab Mutalib N-S, Chin S-F, Jamal R. 16S rRNA Gene Sequencing for Deciphering the Colorectal Cancer Gut Microbiome: Current Protocols and Workflows. *Front Microbiol*. 2018;9:767.
 156. Zhou P, Yang D, Sun D, Zhou Y. Gut microbiome: New biomarkers in early screening of colorectal cancer. *J Clin Lab Anal*. 2022 May 1;36(5):e24359.
 157. Fong W, Li Q, Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene*. 2020 Jun 25;39(26):4925–43.
 158. Tárraga López PJ, Solera Albero J, Rodríguez-Montes JA. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2014 Jul 14;7:33–46.
 159. Brenner H, Chen C. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *Br J Cancer*. 2018 Oct 2;119(7):785–92.
 160. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update. *Gastroenterol Hepatol*. 2018 Nov 1;41(9):585–96.
 161. Van Leerdam ME, Roos VH, Van Hooft JE, Dekker E, Jover R, Kaminski MF, et al. Endoscopic management of polyposis syndromes: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy*. 2019 Sep 23;51(9):877–95.
 162. van Leerdam ME, Roos VH, van Hooft JE, Balaguer F, Dekker E, Kaminski MF, et al. Endoscopic management of Lynch syndrome and of familial risk of colorectal cancer: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy*. 2019 Nov 9;51(11):1082–93.
 163. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MWY, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of familial risk-colorectal cancer: European Society for medical oncology clinical practice guidelines. *J Clin Oncol*. 2015 Oct 10;33(2):209–17.
 164. Giardiello FM, Allen JJ, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2014 Aug;147(2):502–26.
 165. Leddin D, Lieberman DA, Tse F, Barkun AN, Abou-Setta AM, Marshall JK, et al. Clinical Practice Guideline on Screening for Colorectal Cancer in Individuals With a Family History of Nonhereditary Colorectal Cancer or Adenoma: The Canadian Association of Gastroenterology Banff Consensus. *Gastroenterology*. 2018 Nov 1;155(5):1325-1347.e3.

166. Monahan KJ, Bradshaw N, Dolwani S, Desouza B, Dunlop MG, East JE, et al. Guidelines for the management of hereditary colorectal cancer from the British Society of Gastroenterology (BSG)/Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland (ACPGBI)/United Kingdom Cancer Genetics Group (UKCGG). *Gut*. 2020 Mar 1;69(3):411–44.
167. Ziai J, Matloff E, Choi J, Kombo N, Materin M, Bale AE. Defining the polyposis/colorectal cancer phenotype associated with the Ashkenazi GREM1 duplication: counselling and management recommendations. *Genet Res (Camb)*. 2016 Mar 7;98:e5.
168. Shergill AK, Lightdale JR, Bruining DH, Acosta RD, Chandrasekhara V, Chathadi K V., et al. The role of endoscopy in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc*. 2015 May 1;81(5):1101-1121.e13.
169. Sicilia B, Vicente R, Arias L, Echarri A, Zabana Y, Mañosa M, et al. Recommendations of the Spanish Working Group on Crohn's disease and Ulcerative Colitis (Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa — GETECCU) on dysplasia screening in inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jun 1;44(6):435–47.
170. Römken TEH, Kampschreur MT, Drenth JPH, van Oijen MGH, de Jong DJ. High mucosal healing rates in 5-ASA-treated ulcerative colitis patients: results of a meta-analysis of clinical trials. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Nov;18(11):2190–8.
171. Stolfi C, De Simone V, Pallone F, Monteleone G. Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and mesalazine in the chemoprevention of colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2013 Sep 3;14(9):17972–85.
172. Bonovas S, Fiorino G, Lytras T, Nikolopoulos G, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Systematic review with meta-analysis: use of 5-aminosalicylates and risk of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017 May 1;45(9):1179–92.
173. Zeng J, Meng Z-M, Huang X-L, Gan H-T. Effects of 5-aminosalicylates or thiopurines on the progression of low-grade dysplasia in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2021 Jan 1;36(1):11–8.
174. Lutgens MWMD, Oldenburg B, Siersema PD, van Bodegraven AA, Dijkstra G, Hommes DW, et al. Colonoscopic surveillance improves survival after colorectal cancer diagnosis in inflammatory bowel disease. *Br J Cancer*. 2009 Nov 17;101(10):1671–5.
175. Konijeti GG, Shrive MG, Ananthakrishnan AN, Chan AT. Cost-effectiveness analysis of chromoendoscopy for colorectal cancer surveillance in patients with ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc*. 2014 Mar;79(3):455–65.
176. Eluri S, Parian AM, Limketkai BN, Ha CY, Brant SR, Dudley-Brown S, et al. Nearly a Third of High-Grade Dysplasia and Colorectal Cancer Is Undetected in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2017 Dec;62(12):3586–93.
177. Moussata D, Allez M, Cazals-Hatem D, Treton X, Laharie D, Reimund J-M, et al. Are random biopsies still useful for the detection of neoplasia in patients with IBD

- undergoing surveillance colonoscopy with chromoendoscopy? *Gut*. 2018 Jan 23;67:616–24.
178. Murphy J, Kalkbrenner KA, Pemberton JH, Landmann RG, Heppell JP, Young-Fadok TM, et al. Dysplasia in ulcerative colitis as a predictor of unsuspected synchronous colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2014 Aug;57(8):993–8.
 179. Wang YR, Cangemi JR, Loftus E V., Picco MF. Rate of early/missed colorectal cancers after colonoscopy in older patients with or without inflammatory bowel disease in the united states. *Am J Gastroenterol*. 2013 Mar;108(3):444–9.
 180. Sanduleanu S, Rutter MD. Interval colorectal cancers in inflammatory bowel disease: the grim statistics and true stories. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2014 Jul;24(3):337–48.
 181. Laine L, Kaltenbach T, Barkun A, McQuaid KR, Subramanian V, Soetikno R. SCENIC international consensus statement on surveillance and management of dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2015 Mar 1;148(3):639–651.e28.
 182. Bisschops R, Bessissow T, Joseph JA, Baert F, Ferrante M, Ballet V, et al. Chromoendoscopy versus narrow band imaging in UC: a prospective randomised controlled trial. *Gut*. 2018 Jun;67(6):1087–94.
 183. Melville DM, Jass JR, Morson BC, Pollock DJ, Richman PI, Shepherd NA, et al. Observer study of the grading of dysplasia in ulcerative colitis: comparison with clinical outcome. *Hum Pathol*. 1989 Oct;20(10):1008–14.
 184. Neumann H, Vieth M, Langner C, Neurath MF, Mudter J. Cancer risk in IBD: how to diagnose and how to manage DALM and ALM. *World J Gastroenterol*. 2011 Jul 21;17(27):3184–91.
 185. Hirata I. The present status and problems with diagnosis and management of dysplasia/colitic cancer in ulcerative colitis. *Clin J Gastroenterol*. 2008 Dec 5;1(4):139–44.
 186. Chen R, Lai LA, Brentnall TA, Pan S. Biomarkers for colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Sep 21;22(35):7882–91.
 187. Rabinovitch PS, Dziadon S, Brentnall TA, Emond MJ, Crispin DA, Haggitt RC, et al. Pancolonic chromosomal instability precedes dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Cancer Res*. 1999 Oct 15;59(20):5148–53.
 188. Yoshizawa S, Matsuoka K, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, et al. Clinical significance of serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis and its carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Jul;13(7):865–73.
 189. Kisiel JB, Garrity-Park MM, Taylor WR, Smyrk TC, Ahlquist DA. Methylated eyes absent 4 (EyA4) gene promotor in non-neoplastic mucosa of ulcerative colitis patients with colorectal cancer: Evidence for a field effect. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Sep;19(10):2079–83.

190. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, et al. Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2011 Jun;10(2):134–41.
191. Guo Y, Bao Y, Yang W. Regulatory miRNAs in Colorectal Carcinogenesis and Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 22;18(4):890.
192. Rahmani F, Avan A, Hashemy SI, Hassanian SM. Role of Wnt/ β -catenin signaling regulatory microRNAs in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2018 Feb;233(2):811–7.
193. Strubberg AM, Madison BB. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Dis Model Mech*. 2017 Mar 1;10(3):197–214.
194. Hutchison J, Cohen Z, Onyeagucha BC, Funk J, Nelson MA. How microRNAs influence both hereditary and inflammatory-mediated colon cancers. *Cancer Genet*. 2013;206(9–10):309–16.
195. James JJP, Riis LLB, Malham M, Høgdall E, Langholz E, Nielsen BBS. MicroRNA Biomarkers in IBD-Differential Diagnosis and Prediction of Colitis-Associated Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 1;21(21):1–19.
196. Chapman CG, Pekow J. The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2015 Jan 25;8(1):4–22.
197. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Barnes C, Dworkin AM, Weller C, et al. Differential microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2012 Mar;33(3):551–60.
198. Olaru A V, Yamanaka S, Vazquez C, Mori Y, Cheng Y, Abraham JM, et al. MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Mar;19(3):471–80.
199. Biswas S, Ellis AJ, Guy R, Savage H, Madronal K, East JE. High prevalence of hyperplastic polyposis syndrome (serrated polyposis) in the NHS bowel cancer screening programme. *Gut*. 2013 Mar;62(3):475.
200. East JE, Saunders BP, Jass JR. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Mar;37(1):25–46, v.
201. Lage P, Cravo M, Sousa R, Chaves P, Salazar M, Fonseca R, et al. Management of Portuguese patients with hyperplastic polyposis and screening of at-risk first-degree relatives: A contribution for future guidelines based on a clinical study. *Am J Gastroenterol*. 2004 Sep;99(9):1779–84.
202. Hawkins NJ, Gorman P, Tomlinson IPM, Bullpitt P, Ward RL. Colorectal carcinomas arising in the hyperplastic polyposis syndrome progress through the chromosomal instability pathway. *Am J Pathol*. 2000 Aug;157(2):385–92.
203. Ferrández A, Samowitz W, DiSario JA, Burt RW. Phenotypic characteristics and risk of

- cancer development in hyperplastic polyposis: case series and literature review. *Am J Gastroenterol*. 2004 Oct;99(10):2012–8.
204. Hiraoka S, Kato J, Fujiki S, Kaji E, Morikawa T, Murakami T, et al. The presence of large serrated polyps increases risk for colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Nov;139(5):1503–10, 1510.e1-3.
 205. Snover D, Ahnen D, Burt R, Odze R. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated (“hyperplastic”) polyposis. In: Bosman S, Carneiro F, Hruban R, Theise N, editors. *WHO Classification of tumours of the digestive system*. Springer-V. Berlin; 2010.
 206. Bleijenberg AGCC, IJspeert JEGG, Carballal S, Pellise M, Jung G, Van Herwaarden YJ, et al. Low Incidence of Advanced Neoplasia in Serrated Polyposis Syndrome After (Sub)total Colectomy: Results of a 5-Year International Prospective Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2019 Sep 9;114(9):1512–9.
 207. Balaguer F, Pellise M. Colorectal cancer: serrated polyposis--should we screen first-degree relatives? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jun 22;11(6):333–4.
 208. Rodríguez-Alcalde D, Carballal S, Moreira L, Hernández L, Rodríguez-Alonso L, Rodríguez-Moranta F, et al. High incidence of advanced colorectal neoplasia during endoscopic surveillance in serrated polyposis syndrome. *Endoscopy*. 2019 Feb 1;51(2):142–51.
 209. IJspeert JEG, Rana SAQ, Atkinson NSS, van Herwaarden YJ, Bastiaansen BAJ, van Leerdam ME, et al. Clinical risk factors of colorectal cancer in patients with serrated polyposis syndrome: a multicentre cohort analysis. *Gut*. 2017 Feb;66(2):278–84.
 210. Zauber AG, Lansdorp-Vogelaar I, Knudsen AB, Wilschut J, Van Ballegooijen M, Kuntz KM. Evaluating test strategies for colorectal cancer screening: A decision analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. Vol. 149, *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians; 2008. p. 659–69.
 211. Hassan C, Quintero E, Dumonceau J-M, Regula J, Brandão C, Chaussade S, et al. Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy*. 2013 Oct;45(10):842–51.
 212. Hassan C, Antonelli G, Dumonceau J-M, Regula J, Bretthauer M, Chaussade S, et al. Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline - Update 2020. *Endoscopy*. 2020 Aug 1;52(8):687–700.
 213. Desomer L, Tate DJ, Jayanna M, Pellise M, Awadie H, Burgess NG, et al. The clinical significance and synchronous polyp burden of large (≥ 20 mm) sessile serrated polyps in patients without serrated polyposis syndrome. *Endoscopy*. 2018 Nov;50(11):1080–8.
 214. Zhou MJ, Lebwohl B, Krigel A. Patient and Physician Factors Associated with Adenoma and Sessile Serrated Lesion Detection Rates. *Dig Dis Sci*. 2020 Nov 1;65(11):3123–31.
 215. Cavicchi M, Tharsis G, Burtin P, Cattani P, Venezia F, Tordjman G, et al. Difference in

- Physician- and Patient-Dependent Factors Contributing to Adenoma Detection Rate and Serrated Polyp Detection Rate. *Dig Dis Sci*. 2019 Dec 1;64(12):3579–88.
216. Tadepalli US, Feihel D, Miller KM, Itzkowitz SH, Freedman JS, Kornacki S, et al. A morphologic analysis of sessile serrated polyps observed during routine colonoscopy (with video). *Gastrointest Endosc*. 2011 Dec;74(6):1360–8.
 217. Bretagne JF, Hamonic S, Piette C, Viel JF, Bouguen G. Interendoscopist variability in proximal colon polyp detection is twice higher for serrated polyps than adenomas. *World J Gastroenterol*. 2016 Oct 14;22(38):8549–57.
 218. van Toledo DEFWM, IJspeert JEG, Bossuyt PMM, Bleijenberg AGC, van Leerdam ME, van der Vlugt M, et al. Serrated polyp detection and risk of interval post-colonoscopy colorectal cancer: a population-based study. *lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022 Aug;7(8):747–54.
 219. Desai M, Anderson JC, Kaminski M, Thoguluva Chandrasekar V, Fathallah J, Hassan C, et al. Sessile serrated lesion detection rates during average risk screening colonoscopy: A systematic review and meta-analysis of the published literature. *Endosc Int Open*. 2021 Apr;09(04):E610–20.
 220. López-Vicente J, Rodríguez-Alcalde D, Hernández L, Riu Pons F, Vega P, Herrero Rivas JM, et al. Panchromoendoscopy Increases Detection of Polyps in Patients With Serrated Polyposis Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019 Sep 23;17(10):2016-2023.e6.
 221. Tribonias G, Theodoropoulou A, Stylianou K, Giotis I, Mpitouli A, Moschovis D, et al. Irrigating Acetic Acid Solution During Colonoscopy for the Detection of Sessile Serrated Neoplasia: A Randomized Controlled Trial. *Dig Dis Sci*. 2022 Jan 1;67(1):282–92.
 222. Aziz M, Desai M, Hassan S, Fatima R, Dasari CS, Chandrasekar VT, et al. Improving serrated adenoma detection rate in the colon by electronic chromoendoscopy and distal attachment: systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc*. 2019 Nov 1;90(5):721-731.e1.
 223. Aziz M, Fatima R, Lee-Smith W, Khuder S, Nawras A. Comparing endoscopic interventions to improve serrated adenoma detection rates during colonoscopy: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Oct;32(10):1284–92.
 224. Li J, Zhang D, Wei Y, Chen K, Wu R, Peng K, et al. Colorectal Sessile Serrated Lesion Detection Using Linked Color Imaging: A Multicenter, Parallel Randomized Controlled Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2023 Feb;21(2):328-336.e2.
 225. Staudenmann D, Liu K, Varma P, Wong M, Rai S, Tsoutsman T, et al. Narrow band imaging versus white light for detecting sessile serrated lesion: A prospective randomized multicenter study. *DEN open*. 2022 Apr;2(1):e44.
 226. Riu Pons F, Andreu M, Naranjo D, Álvarez-González MA, Seoane A, Dedeu JM, et al. Narrow-band imaging and high-definition white-light endoscopy in patients with serrated lesions not fulfilling criteria for serrated polyposis syndrome: a randomized

- controlled trial with tandem colonoscopy. *BMC Gastroenterol*. 2020 Apr 16;20(1):111.
227. Shao PP, Shao CR, Romero T, Leung FW. Sessile serrated adenoma/polyp detection rate of water exchange, Endocuff, and cap colonoscopy: A network meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021 Dec 1;36(12):3268–77.
 228. Aziz M, Mehta TI, Weissman S, Sharma S, Fatima R, Khan Z, et al. Do Water-aided Techniques Improve Serrated Polyp Detection Rate During Colonoscopy?: A Systematic Review With Meta-Analysis. *J Clin Gastroenterol*. 2021 Jul 1;55(6):520–7.
 229. Rivero-Sánchez L, López Vicente J, Hernandez Villalba L, Puig I, Arnau-Collell C, Moreno L, et al. Endocuff-assisted colonoscopy for surveillance of serrated polyposis syndrome: a multicenter randomized controlled trial. *Endoscopy*. 2019 Jul 7;51(7):637–45.
 230. Boparai KS, Dekker E, Van Eeden S, Polak MM, Bartelsman JFWM, Mathus-Vliegen EMH, et al. Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology*. 2008 Dec;135(6):2014–8.
 231. Buchanan D, Young J. A perspective on bi-allelic MUTYH mutations in patients with hyperplastic polyposis syndrome. *Gastroenterology*. 2009 Jun;136(7):2407–8.
 232. Heald B, Mester J, Rybicki L, Orloff MS, Burke CA, Eng C. Frequent gastrointestinal polyps and colorectal adenocarcinomas in a prospective series of PTEN mutation carriers. *Gastroenterology*. 2010 Dec;139(6):1927–33.
 233. Buchanan DD, Clendenning M, Zhuoer L, Stewart JR, Joseland S, Woodall S, et al. Lack of evidence for germline RNF43 mutations in patients with serrated polyposis syndrome from a large multinational study. *Gut*. 2017 Jun 1;66(6):1170–2.
 234. van Herwaarden YJ, Koggel LM, Simmer F, Vink-Börger EM, Dura P, Meijer GA, et al. RNF43 mutation analysis in serrated polyposis, sporadic serrated polyps and Lynch syndrome polyps. *Histopathology*. 2021 Apr 1;78(5):749–58.
 235. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol*. 2015 Feb 5;110(2):223–62.
 236. Walker RG, Landmann JK, Hewett DG, Worthley DL, Buttenshaw RL, Knight N, et al. Hyperplastic polyposis syndrome is associated with cigarette smoking, which may be a modifiable risk factor. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jul;105(7):1642–7.
 237. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Dvorak K, Garewal H. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. Vol. 260, *Cancer Letters*. 2008. p. 1–10.
 238. Luo Y, Yu M, Grady WM. Field cancerization in the colon: a role for aberrant DNA methylation? *Gastroenterol Rep*. 2014 Feb 1;2(1):16–20.
 239. Worthley DL, Whitehall VLJ, Buttenshaw RL, Irahara N, Greco SA, Ramsnes I, et al. DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene*. 2010 Mar;29(11):1653–62.
 240. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar

- 4;144(5):646–74.
241. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, Cancer Discovery. Cancer Discov; 2022. p. 31–46.
 242. Abi Zamer B, Abumustafa W, Hamad M, Maghazachi AA, Muhammad JS. Genetic Mutations and Non-Coding RNA-Based Epigenetic Alterations Mediating the Warburg Effect in Colorectal Carcinogenesis. *Biology (Basel)*. 2021 Aug 30;10(9).
 243. Rmali KA, Puntis MCA, Jiang WG. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Color Dis*. 2007 Jan;9(1):3–14.
 244. Bujko M, Kober P, Mikula M, Ligaj M, Ostrowski J, Siedlecki JA. Expression changes of cell-cell adhesion-related genes in colorectal tumors. *Oncol Lett*. 2015 Jun;9(6):2463–70.
 245. Findlay VJ, Wang C, Watson DK, Camp ER. Epithelial-to-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype: insights from cancer biology with therapeutic implications for colorectal cancer. *Cancer Gene Ther*. 2014 May 2;21(5):181–7.
 246. Kaller M, Hermeking H. Interplay Between Transcription Factors and MicroRNAs Regulating Epithelial-Mesenchymal Transitions in Colorectal Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016;937:71–92.
 247. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Nov 19;445(7123):111–5.
 248. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, et al. Visualization and targeting of LGR5 + human colon cancer stem cells. *Nature*. 2017 May 11;545(7653):187–92.
 249. Hsu HC, Liu YS, Tseng KC, Hsu CL, Liang Y, Yang TS, et al. Overexpression of Lgr5 correlates with resistance to 5-FU-based chemotherapy in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Nov;28(11):1535–46.
 250. Williams ED, Gao D, Redfern A, Thompson EW. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2019 Dec 1;19(12):716–32.
 251. Ilina O, Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci*. 2009 Sep 15;122(Pt 18):3203–8.
 252. Cañellas-Socias A, Cortina C, Hernando-Momblona X, Palomo-Ponce S, Mulholland EJ, Turon G, et al. Metastatic recurrence in colorectal cancer arises from residual EMP1+ cells. *Nature*. 2022 Nov 17;611(7936):603–13.
 253. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2015 Dec 11;7(4):2443–58.
 254. Mao X, Xu J, Wang W, Liang C, Hua J, Liu J, et al. Crosstalk between cancer-associated

- fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer*. 2021 Dec 11;20(1):131.
255. Linares J, Marín-Jiménez JA, Badia-Ramentol J, Calon A. Determinants and Functions of CAFs Secretome During Cancer Progression and Therapy. *Front cell Dev Biol*. 2020 Jan 22;8:621070.
 256. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1909;5:273–90.
 257. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991–8.
 258. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):1–10.
 259. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
 260. Ricciuti B, Wang X, Alessi J V., Rizvi H, Mahadevan NR, Li YY, et al. Association of High Tumor Mutation Burden in Non-Small Cell Lung Cancers With Increased Immune Infiltration and Improved Clinical Outcomes of PD-L1 Blockade Across PD-L1 Expression Levels. *JAMA Oncol*. 2022 Aug 1;8(8):1160–8.
 261. Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, et al. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 1;102(44):16013–8.
 262. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*. 2016 Mar 15;44(3):698–711.
 263. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):459–65.
 264. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996 Mar 22;271(5256):1734–6.
 265. Pedoeem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, Silverman GJ, Mor A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2014 Jul;153(1):145–52.
 266. Koelzer VH, Dawson H, Andersson E, Karamitopoulou E, Masucci G V., Lugli A, et al. Active immunosurveillance in the tumor microenvironment of colorectal cancer is associated with low frequency tumor budding and improved outcome. *Transl Res*. 2015 Aug 1;166(2):207–17.
 267. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002 Aug;8(8):793–800.
 268. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity.

- Immunol Rev. 2010 Jul;236(1):219–42.
269. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014:149185.
 270. Bayik D, Lathia JD. Cancer stem cell–immune cell crosstalk in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2021 Aug 8;21(8):526–36.
 271. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):889–96.
 272. Tauriello DVF, Sancho E, Batlle E. Overcoming TGF β -mediated immune evasion in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2022 Jan 20;22(1):25–44.
 273. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989 Aug 23;8(2):98–101.
 274. Galindo-Pumariño C, Collado M, Herrera M, Peña C. Tumor Microenvironment in Metastatic Colorectal Cancer: The Arbitrator in Patients' Outcome. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 6;13(5):1–29.
 275. Dmello RS, To SQ, Chand AL. Therapeutic Targeting of the Tumour Microenvironment in Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 19;22(4):1–18.
 276. Yu J, Green MD, Li S, Sun Y, Journey SN, Choi JE, et al. Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination. *Nat Med*. 2021 Jan 1;27(1):152–64.
 277. Siveen KS, Raza A, Ahmed EI, Khan AQ, Prabhu KS, Kuttikrishnan S, et al. The Role of Extracellular Vesicles as Modulators of the Tumor Microenvironment, Metastasis and Drug Resistance in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 May 29;11(6).
 278. Francescangeli F, Contavalli P, De Angelis ML, Careccia S, Signore M, Haas TL, et al. A pre-existing population of ZEB2+ quiescent cells with stemness and mesenchymal features dictate chemoresistance in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020 Dec 8;39(1):2.
 279. Das S, Ciombor KK, Haraldsdottir S, Goldberg RM. Promising New Agents for Colorectal Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2018 May 11;19(6):29.
 280. Hu L-F, Lan H-R, Huang D, Li X-M, Jin K-T. Personalized Immunotherapy in Colorectal Cancers: Where Do We Stand? *Front Oncol*. 2021 Nov 23;11:769305.
 281. Sherwood LM, Parris EE, Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182–6.
 282. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jul 29;333(2):328–35.
 283. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular

- endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):841–4.
284. Baraniskin A, Buchberger B, Pox C, Graeven U, Holch JW, Schmiegel W, et al. Efficacy of bevacizumab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2019 Jan 1;106:37–44.
 285. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 17;99(19):12293–7.
 286. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012 Apr;24(2):207–12.
 287. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
 288. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2455–65.
 289. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov*. 2018 Sep 1;8(9):1069–86.
 290. Jung G, Benítez-Ribas D, Sánchez A, Balaguer F. Current Treatments of Metastatic Colorectal Cancer with Immune Checkpoint Inhibitors-2020 Update. *J Clin Med*. 2020 Oct 31;9(11):3520.
 291. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):124–8.
 292. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*. 2014 Oct 1;20(19):5064–74.
 293. Bilgin B, Sendur MAN, Bülent Akıncı M, Şener Dede D, Yalçın B. Targeting the PD-1 pathway: a new hope for gastrointestinal cancers. *Curr Med Res Opin*. 2017 Apr 3;33(4):749–59.
 294. Lin H, Wei S, Hurt EM, Green MD, Zhao L, Vatan L, et al. Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest*. 2018 Feb 1;128(2):805–15.
 295. Miller BC, Sen DR, Al Abosy R, Bi K, Virkud Y V., LaFleur MW, et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol*. 2019 Mar 1;20(3):326–36.
 296. Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, Qi Y, Wang C, Kageyama R, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat Med*. 2019 Aug 1;25(8):1251–9.

297. Callahan MK, Wolchok JD. Recruit or Reboot? How Does Anti-PD-1 Therapy Change Tumor-Infiltrating Lymphocytes? *Cancer Cell*. 2019 Sep 16;36(3):215–7.
298. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
299. Chung KY, Gore I, Fong L, Venook A, Beck SB, Dorazio P, et al. Phase II study of the anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody, tremelimumab, in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 20;28(21):3485–90.
300. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz H-J, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Mar 10;36(8):773–9.
301. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jun 1;16(6):361–75.
302. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 2018 Feb 22;554(7693):544–8.
303. Tauriello DVFF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llargo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. 2018 Feb 14;554(7693):538–43.
304. Gunderson AJ, Yamazaki T, McCarty K, Fox N, Phillips M, Alice A, et al. TGF β suppresses CD8 $^{+}$ T cell expression of CXCR3 and tumor trafficking. *Nat Commun*. 2020 Apr 9;11(1):1749.
305. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DVF, Iglesias M, Céspedes MV, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*. 2012 Nov 13;22(5):571–84.
306. Chiorean EG, Nandakumar G, Fadelu T, Temin S, Alarcon-Rozas AE, Bejarano S, et al. Treatment of Patients With Late-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Glob Oncol*. 2020 Mar;6(6):414–38.
307. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2020 Oct 1;31(10):1291–305.
308. Gómez-España MA, Gallego J, González-Flores E, Maurel J, Páez D, Sastre J, et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer (2018). *Clin Transl Oncol*. 2019 Jan 25;21(1):46–54.
309. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal

- cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016 Aug;27(8):1386–422.
310. Brohée D. 5-Fluorouracil (5FU) with or without folinic acid (LV) in human colorectal cancer? Multivariate meta-analysis of the literature. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. 1991 Dec;8(4):271–80.
 311. Marques RP, Duarte GS, Sterrantino C, Pais HL, Quintela A, Martins AP, et al. Triplet (FOLFOXIRI) versus doublet (FOLFOX or FOLFIRI) backbone chemotherapy as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Oct 1;118:54–62.
 312. Álvarez-Varela A, Novellademunt L, Barriga FM, Hernando-Momblona X, Cañellas-Socias A, Cano-Crespo S, et al. Mex3a marks drug-tolerant persister colorectal cancer cells that mediate relapse after chemotherapy. *Nat Cancer*. 2022 Jun 30;3(9):1052–70.
 313. Xie Y-H, Chen Y-X, Fang J-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Mar 20;5(1):22.
 314. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, et al. Colon cancer, Version 2.2021. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2021;19(3):329–59.
 315. Zhang H, You J, Liu W, Chen D, Zhang S, Wang X. The efficacy and safety of bevacizumab combined with FOLFOX regimen in the treatment of advanced colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Jul 30;100(30):e26714.
 316. Jácome AA, Oliveira FA, Lino F, Lima JPSN. Effect of Adding Bevacizumab to Chemotherapy on Pathologic Response to Preoperative Systemic Therapy for Resectable Colorectal Liver Metastases: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2021 Sep 1;20(3):265–72.
 317. Salvatore L, Bria E, Sperduti I, Hinke A, Hegewisch-Becker S, Aparicio T, et al. Bevacizumab as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of individual patients' data from 3 phase III studies. *Cancer Treat Rev*. 2021 Jun 1;97:102202.
 318. Xie X, Zhang J, Hu H, Cai Y, Wu Z, Ling J, et al. Efficacy and Safety of Regorafenib in Combination with Chemotherapy as Second-Line Treatment in Patients with Metastatic Colorectal Cancer: A Network Meta-Analysis and Systematic Literature Review. *Adv Ther*. 2020 Oct 1;37(10):4233–48.
 319. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2012 Apr 4;307(13):1383–93.
 320. Huang J, Nair SG, Mahoney MR, Nelson GD, Shields AF, Chan E, et al. Comparison of FOLFIRI with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer; NCCTG (Alliance) intergroup trial N0147. *Clin Colorectal Cancer*. 2014;13(2):100–9.
 321. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, et al.

- Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): A phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2012 Dec;13(12):1225–33.
322. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015 Jun 25;372(26):2509–20.
 323. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017 Jul 28;357(6349):409–13.
 324. L. Diaz, A. Marabelle, T.W. Kim, R. Geva, E. Van Cutsem, T. André et al. Efficacy of Pembrolizumab in Phase II Keynote-164 and Keynote-158 Studies of Microsatellite Instability High Cancers. In: *Annals of Oncology.* Madrid; 2017. p. 28 (suppl_5): v122-v141. 10.1093/annonc/mdx367.
 325. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017 Sep;18(9):1182–91.
 326. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, Geva R, Jäger D, Hara H, et al. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability–High/Mismatch Repair–Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol.* 2020 Jan 1;38(1):11–9.
 327. Diaz LA, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2022 May 1;23(5):659–70.
 328. Casak SJ, Marcus L, Fashoyin-Aje L, Mushti SL, Cheng J, Shen YL, et al. FDA approval summary: Pembrolizumab for the first-line treatment of patients with MSI-H/dMMR advanced unresectable or metastatic colorectal carcinoma. Vol. 27, *Clinical Cancer Research.* American Association for Cancer Research Inc.; 2021. p. 4680–4.
 329. Lenz HJ, Van Cutsem E, Luisa Limon M, Wong KYM, Hendlisz A, Aglietta M, et al. First-Line Nivolumab Plus Low-Dose Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study. *J Clin Oncol.* 2022 Jan 10;40(2):161–70.
 330. Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, Van den Berg JG, Aalbers AG, Sikorska K, et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med.* 2020 Apr 6;26(4):566–76.
 331. Villalba M, Evans SR, Vidal-Vanaclocha F, Calvo A. Role of TGF- β in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell Tissue Res.* 2017 Oct 1;370(1):29–39.
 332. Zhang B, Halder SK, Kashikar ND, Cho Y-J, Datta A, Gorden DL, et al. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010 Mar;138(3):969-80.e1-3.

333. Lee H, Kong J-S, Lee S-S, Kim A. Radiation-Induced Overexpression of TGF β and PODXL Contributes to Colorectal Cancer Cell Radioresistance through Enhanced Motility. *Cells*. 2021 Aug 13;10(8).
334. Yang M, Li D, Jiang Z, Li C, Ji S, Sun J, et al. TGF- β -Induced FLRT3 Attenuation Is Essential for Cancer-Associated Fibroblast-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Res*. 2022 Aug 5;20(8):1247–59.
335. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):924–40.
336. Herbertz S, Sawyer JS, Stauber AJ, Gueorguieva I, Driscoll KE, Estrem ST, et al. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:4479–99.
337. Melisi D, Garcia-Carbonero R, Macarulla T, Pezet D, Deplanque G, Fuchs M, et al. TGF β receptor inhibitor galunisertib is linked to inflammation- and remodeling-related proteins in patients with pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019 May;83(5):975–91.
338. Giannelli G, Santoro A, Kelley RK, Gane E, Paradis V, Cleverly A, et al. Biomarkers and overall survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with TGF- β RI inhibitor galunisertib. *PLoS One*. 2020;15(3):e0222259.
339. 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 Jan 1;26(1):13–21.
340. Serebriiskii IG, Connelly C, Frampton G, Newberg J, Cooke M, Miller V, et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nat Commun*. 2019 Aug 19;10(1):3722.
341. Koulis C, Yap R, Engel R, Jardé T, Wilkins S, Solon G, et al. Personalized Medicine-Current and Emerging Predictive and Prognostic Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 28;12(4).
342. Li Y, He M, Zhou Y, Yang C, Wei S, Bian X, et al. The Prognostic and Clinicopathological Roles of PD-L1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2019;10(FEB):139.
343. Le Flahec G, Badic B, Guibourg B, Doucet L, Bail JP, Marcorelles P, et al. Mismatch repair-deficient colorectal cancer: a model of immunogenic and immune cell-rich tumor despite nonsignificant programmed cell death ligand-1 expression in tumor cells. *Hum Pathol*. 2018 Feb 1;72:135–43.
344. Xie J, Wang C, Gore JC. High Throughput Screening for Colorectal Cancer Specific Compounds. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2016;19(3):180–8.
345. Roerink SF, Sasaki N, Lee-Six H, Young MD, Alexandrov LB, Behjati S, et al. Intra-tumour

- diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature*. 2018 Apr 26;556(7702):437–62.
346. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*. 2018 Feb 23;359(6378):920–6.
 347. Yang Y-S, Liu C-Y, Wen D, Gao D-Z, Lin S, He H-F, et al. Recent advances in the development of transplanted colorectal cancer mouse models. *Transl Res*. 2022 Nov;249:128–43.
 348. Neal JT, Li X, Zhu J, Giangarra V, Grzeskowiak CL, Ju J, et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*. 2018 Dec 13;175(7):1972-1988.e16.
 349. Zhu L, Retana D, García-Gómez P, Álvaro-Espinosa L, Priego N, Masmudi-Martín M, et al. A clinically compatible drug-screening platform based on organotypic cultures identifies vulnerabilities to prevent and treat brain metastasis. *EMBO Mol Med*. 2022 Mar 7;14(3):e14552.
 350. Chaturvedi G, Simone PD, Ain R, Soares MJ, Wolfe MW. Noggin maintains pluripotency of human embryonic stem cells grown on Matrigel. *Cell Prolif*. 2009 Aug;42(4):425–33.
 351. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, Kujala P, Van Den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 2007 Oct 25;449(7165):1003–7.
 352. Sebastian S, Hernández V, Myreliid P, Kariv R, Tsianos E, Toruner M, et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). *J Crohns Colitis*. 2014 Jan 1;8(1):5–18.
 353. Tan Y-G, Zhang Y-F, Guo C-J, Yang M, Chen M-Y. Screening of differentially expressed microRNA in ulcerative colitis related colorectal cancer. *Asian Pac J Trop Med*. 2013 Dec;6(12):972–6.
 354. Valeri N, Braconi C, Gasparini P, Murgia C, Lampis A, Paulus-Hock V, et al. MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer Cell*. 2014 Apr 14;25(4):469–83.
 355. Liu B, Liu Y, Zhao L, Pan Y, Shan Y, Li Y, et al. Upregulation of microRNA-135b and microRNA-182 promotes chemoresistance of colorectal cancer by targeting *ST6GALNAC2* via PI3K/AKT pathway. *Mol Carcinog*. 2017 Dec;56(12):2669–80.
 356. Li J, Liang H, Bai M, Ning T, Wang C, Fan Q, et al. miR-135b Promotes Cancer Progression by Targeting Transforming Growth Factor Beta Receptor II (TGFBR2) in Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130194.
 357. Xiang S, Fang J, Wang S, Deng B, Zhu L. MicroRNA-135b regulates the stability of PTEN and promotes glycolysis by targeting *USP13* in human colorectal cancers. *Oncol Rep*. 2015 Mar;33(3):1342–8.
 358. Liu Z, Bai J, Zhang L, Lou F, Ke F, Cai W, et al. Conditional knockout of microRNA-31

- promotes the development of colitis associated cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Aug 12;490(1):62–8.
359. Feng B, Dong TT, Wang LL, Zhou HM, Zhao HC, Dong F, et al. Colorectal cancer migration and invasion initiated by microRNA-106a. *PLoS One*. 2012;7(8):e43452.
 360. Lin J, Cao Q, Zhang J, Li Y, Shen B, Zhao Z, et al. MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease. *Mod Pathol*. 2013 Jan 17;26(1):148–54.
 361. Wu W, Wang Z, Yang P, Yang J, Liang J, Chen Y, et al. MicroRNA-135b regulates metastasis suppressor 1 expression and promotes migration and invasion in colorectal cancer. *Mol Cell Biochem*. 2014 Mar;388(1–2):249–59.
 362. Rhee Y-Y, Kim K-J, Kang GH. CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut Liver*. 2017 Jan 15;11(1):38–46.
 363. Dulberger CL, McMurtrey CP, Hölzemer A, Neu KE, Liu V, Steinbach AM, et al. Human Leukocyte Antigen F Presents Peptides and Regulates Immunity through Interactions with NK Cell Receptors. *Immunity*. 2017 Jun 20;46(6):1018-1029.e7.
 364. Wu B, Yang H, Ying S, Lu H, Wang W, Lv J, et al. High HLA-F Expression Is a Poor Prognosis Factor in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2018;2018:7691704.
 365. Ishigami S, Arigami T, Okumura H, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-F expression in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2015 Apr;35(4):2279–85.
 366. Xu Y, Han H, Zhang F, Lv S, Li Z, Fang Z. Lesion human leukocyte antigen-F expression is associated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2015 Jan 1;9(1):300–4.
 367. Zhang X, Lin A, Zhang JG, Bao WG, Xu DP, Ruan YY, et al. Alteration of HLA-F and HLA i antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2013 Jan 1;132(1):82–9.
 368. Kochan G, Escors D, Breckpot K, Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology*. 2013 Nov 27;2(11):e26491.
 369. Khamas A, Ishikawa T, Mogushi K, Iida S, Ishiguro M, Tanaka H, et al. Genome-wide screening for methylation-silenced genes in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2012 Aug;41(2):490–6.
 370. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009 May;10(5):295–304.
 371. Poddar S, Kesharwani D, Datta M. Interplay between the miRNome and the epigenetic machinery: Implications in health and disease. *J Cell Physiol*. 2017 Nov 1;232(11):2938–45.

372. Kalari S, Pfeifer GP. Identification of Driver and Passenger DNA Methylation in Cancer by Epigenomic Analysis. In: *Advances in Genetics*. 2010. p. 277–308.
373. Bretthauer M, Løberg M, Wieszczy P, Kalager M, Emilsson L, Garborg K, et al. Effect of Colonoscopy Screening on Risks of Colorectal Cancer and Related Death. *N Engl J Med*. 2022 Oct 27;387(17):1547–56.
374. Weeber F, van de Wetering M, Hoogstraat M, Dijkstra KK, Krijgsman O, Kuilman T, et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Oct 27;112(43):13308–11.
375. van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell*. 2015 May;161(4):933–45.
376. Yuki K, Cheng N, Nakano M, Kuo CJ. Organoid Models of Tumor Immunology. *Trends in Immunology Elsevier Ltd*; Aug 1, 2020 p. 652–64.
377. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell*. 2018 Sep 6;174(6):1586-1598.e12.
378. Xie H, Appelt JW, Jenkins RW. Going with the Flow: Modeling the Tumor Microenvironment Using Microfluidic Technology. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 1;13(23).
379. Efremova M, Rieder D, Klepsch V, Charoentong P, Finotello F, Hackl H, et al. Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and changes the dynamics of tumor evolution. *Nat Commun*. 2018 Jan 2;9(1):32.
380. O'Rourke KP, Loizou E, Livshits G, Schatoff EM, Baslan T, Manchado E, et al. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer. *Nat Biotechnol*. 2017 Jun 1;35(6):577–82.
381. Langan LM, Dodd NJF, Owen SF, Purcell WM, Jackson SK, Jha AN. Direct Measurements of Oxygen Gradients in Spheroid Culture System Using Electron Parametric Resonance Oximetry. *PLoS One*. 2016 Feb 22;11(2):e0149492.
382. Grosso JF, Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun*. 2013;13(1):5.
383. Usui T, Sakurai M, Enjoji S, Kawasaki H, Umata K, Ohama T, et al. Establishment of a Novel Model for Anticancer Drug Resistance in Three-Dimensional Primary Culture of Tumor Microenvironment. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7053872.
384. Finnberg NK, Gokare P, Lev A, Grivennikov SI, MacFarlane AW, Campbell KS, et al. Application of 3D tumoroid systems to define immune and cytotoxic therapeutic responses based on tumoroid and tissue slice culture molecular signatures. *Oncotarget*. 2017 Sep 15;8(40):66747–57.
385. Ganesh K, Wu C, O'Rourke KP, Szeglin BC, Zheng Y, Sauvé C-EG, et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation. *Nat Med*. 2019 Oct

- 7;25(10):1607–14.
386. Yao Y, Xu X, Yang L, Zhu J, Wan J, Shen L, et al. Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell*. 2020 Jan 2;26(1):17-26.e6.
 387. Yin S, Xi R, Wu A, Wang S, Li Y, Wang C, et al. Patient-derived tumor-like cell clusters for drug testing in cancer therapy. *Sci Transl Med*. 2020 Jun 24;12(549):eaaz1723.
 388. Ooft SN, Weeber F, Schipper L, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, et al. Prospective experimental treatment of colorectal cancer patients based on organoid drug responses. *ESMO Open*. 2021 Jun 1;6(3):100103.
 389. Furbo S, Urbano PCM, Raskov HH, Troelsen JT, Kanstrup Fiehn A-M, Gögenur I. Use of Patient-Derived Organoids as a Treatment Selection Model for Colorectal Cancer: A Narrative Review. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 20;14(4):1069.
 390. Wang T, Pan W, Zheng H, Zheng H, Wang Z, Li JJ, et al. Accuracy of Using a Patient-Derived Tumor Organoid Culture Model to Predict the Response to Chemotherapy Regimens In Stage IV Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2021 Jul 3;64(7):833–50.
 391. Grönholm M, Feodoroff M, Antignani G, Martins B, Hamdan F, Cerullo V. Patient-Derived Organoids for Precision Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*. 2021 Jun 15;81(12):3149–55.
 392. Wörsdörfer P, Dalda N, Kern A, Krüger S, Wagner N, Kwok CK, et al. Generation of complex human organoid models including vascular networks by incorporation of mesodermal progenitor cells. *Sci Rep*. 2019 Oct 30;9(1):15663.
 393. Grebenyuk S, Ranga A. Engineering Organoid Vascularization. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019 Mar 19;7(MAR):39.
 394. Nashimoto Y, Hayashi T, Kunita I, Nakamasu A, Torisawa Y, Nakayama M, et al. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integr Biol (Camb)*. 2017 Jun 19;9(6):506–18.
 395. Williamson IA, Arnold JW, Samsa LA, Gaynor L, DiSalvo M, Cocchiari JL, et al. A High-Throughput Organoid Microinjection Platform to Study Gastrointestinal Microbiota and Luminal Physiology. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jan 1;6(3):301–19.
 396. Holokai L, Chakrabarti J, Broda T, Chang J, Hawkins JA, Sundaram N, et al. Increased Programmed Death-Ligand 1 is an Early Epithelial Cell Response to *Helicobacter pylori* Infection. *PLoS Pathog*. 2019 Jan 31;15(1):e1007468.
 397. Crockett SD, Nagtegaal ID. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*. 2019 Oct 1;157(4):949-966.e4.

