



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio proteómico en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colo-rectal. Identificación de diferentes perfiles proteómicos en relación a los criterios clínico patológicos convencionales de gravedad

Adalgiza Reyes Romero

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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

ESTUDIO PROTEÓMICO EN PACIENTES CON METÁSTASIS  
HEPÁTICAS DE CÁNCER COLO-RECTAL. IDENTIFICACIÓN  
DE DIFERENTES PERFILES PROTEÓMICOS EN RELACIÓN A  
LOS CRITERIOS CLÍNICO PATOLÓGICOS CONVENCIONALES  
DE GRAVEDAD

TESIS PRESENTADA POR

ADALGIZA REYES ROMERO

Para optar el grado de Doctor en Medicina

Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona

Barcelona, mayo 2017



**ESTUDIO PROTEÓMICO EN PACIENTES CON METÁSTASIS  
HEPÁTICAS DE CÁNCER COLO-RECTAL. IDENTIFICACIÓN  
DE DIFERENTES PERFILES PROTEÓMICOS EN RELACIÓN A  
LOS CRITERIOS CLÍNICO PATOLÓGICOS CONVENCIONALES DE  
GRAVEDAD**

**Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en  
Medicina**

Barcelona, mayo 2017

**DIRECTOR: Prof. Josep Fuster Obregón**

Catedrático de Cirugía

Universidad de Barcelona

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Cirugía Y Especialidades Quirúrgicas**

**Universidad de Barcelona**





Facultat de Medicina  
**Dept. de Cirurgia i Especialitats  
Quirúrgiques**

Casanova, 143  
08036 Barcelona  
Tel 934039684

El abajo firmante: Profesor Dr. Josep Fuster Obregón, Catedrático de Cirugía de la *Facultad de Medicina* de la *Universidad de Barcelona*, como director

**CERTIFICA**, que la tesis doctoral titulada "**Estudio proteómico en pacientes con Metástasis hepáticas de cáncer colo-rectal. Identificación de diferentes perfiles proteómicos en relación a los criterios clínico patológicos convencionales de gravedad**", realizada por la doctoranda Adalgiza Reyes Romero, para obtener el grado de Doctor en Medicina, se halla en condiciones de ser leída ante el tribunal correspondiente.

Ello se hace constar en Barcelona, a 15 de mayo de 2017.

Profesor Dr. Josep Fuster Obregón



*A Dios la gloria y honra ante todos y ante mí. A mi padre Rafael Reyes Ricardo (QEPD), a mi madre Adalgiza Romero de Reyes. A mis hijos Carlos Andrés, Alejandra y Andrea Carolina. A mis hermanos Alfonso, Evelia, Alberto, Nanda y cuñados Rolando, Lorena y Enolmira. A mis tíos, sobrinos y primos. Han sido mi apoyo fundamental.*

“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”.

“La mente es igual que un paracaídas, solo funciona si se abre”

“En el universo, las diferentes dimensiones están conectadas por una armonía dinámica. La humanidad pertenece a la inteligencia cósmica. Nada es casualidad, Dios no tira los dados; entramos en un espacio eterno e interminable de infinitas dimensiones”.

**Albert Einstein (Alemania, 14/03/1879- USA, 18/04/1955).**





## AGRADECIMIENTOS

---

---

A DIOS, ante todo, a mi mamá Adalgiza Romero de Reyes y a mi papá Rafael Reyes Ricardo que en paz descansa, mis hijos Carlos Andrés, Alejandra y Andrea Carolina, quienes han estado conmigo siempre, a mis sobrinos, mis hermanos y cuñados por ser mi soporte permanente e incondicional, por quienes nace y llega a su meta este plan de vida. Gracias al padre de mis hijos por su apoyo para con ellos. Dios y mi familia han sido mi fuente de inspiración constante. A ellos dedico todo mi esfuerzo y sacrificio.

Al Prof. Dr. José Fuster Obregón, Catedrático de Cirugía de la Universidad de Barcelona y director de tesis, porque creyó en mí. Por haber compartido conmigo sus conocimientos en Cirugía y Trasplante Hepático, por su tenacidad, perseverancia y su dedicación en todos y cada uno de los pasos dados durante el desarrollo del proyecto de tesis y trabajos de investigación, de la mano del grupo de bioquímicos que hicieron con nosotros parte fundamental para que todo pudiese ser una realidad, con resultados que pueden ser de utilidad en medicina y bioquímica. Gracias por haber dedicado su tiempo e interés en el desarrollo de las áreas de conocimiento científico y de investigación durante el doctorado en mi persona, ha sido mi guía y acompañamiento profesional idóneo. Sus enseñanzas me han abierto caminos en los ámbitos profesional, académico y de investigación.

Al Prof. Dr. Juan Carlos García-Valdecasas, Catedrático de Cirugía de la Universidad de Barcelona, Jefe de Servicio de Cirugía del Hospital Clínic, gracias por haberme dado la oportunidad de estar presente en este extraordinario grupo de profesionales. Por permitirme un aprendizaje a través de sus conocimientos en Cirugía y Trasplante Hepático, por cada una de las sesiones clínicas en las que disfrutamos y aprovechamos personal, académica y profesionalmente todos con la puntual presencia del Dr. Fuster, el Dr. Fondevila y de todo el staff, convirtiendo así a las sesiones clínicas en un pilar fundamental para que el equipo de Cirugía Hepática y Trasplante Hepático del Hospital Clínic de Barcelona sea el estandarte que hoy es. Gracias por la confianza depositada en mi persona durante estos años. Sin todo lo anterior, esta tesis doctoral no habría sido posible.

Al Dr. Constantino Fondevila, Profesor Asociado de la Universidad de Barcelona. Gracias por su incondicional apoyo, por sus enseñanzas en el día a día y por ser un ejemplo de dedicación profesional y de excelencia como Cirujano hepático y como gran ser humano.

Al Prof. Dr. Vicente Arroyo, Catedrático de Medicina de la Universidad de Barcelona; sin su invitación a Barcelona, este proyecto de vida no hubiese existido y nada de todo lo vivido en estos siete años hubiese sido posible. Gracias por creer en mí y abrirme las puertas en el

Hospital Clinic de Barcelona, usted es una de las fuentes de inspiración para continuar hasta la culminación de esta meta.

Al Dr. Wladimiro Jiménez Jefe de Bioquímica del Hospital Clinic de Barcelona quien creyó en mí y nuestro proyecto. Al Dr. Santi Marfá quien ha sido mi mano derecha y compañero de trabajo hombro a hombro para la consecución de los mejores resultados en esta investigación. A la Dra. Vedrana R. quien me enseñó lo poco que sé en procedimientos bioquímicos para poder así trabajar con el Departamento de Bioquímica de manera eficiente en esta investigación. Al personal del Centro de Investigación Esther Koplovitz por la amabilidad y permitir mi entrenamiento y hacer parte de la investigación en sus instalaciones.

Al Profesor Dr. Pere Ginés que me abrió puertas y ha sido un apoyo incondicional.

A la Dra. Pilar Taurá, mujer ejemplar, íntegra y profesional brillante y consagrada, con un agradecimiento sin medida por su apoyo incondicional, su mano en momentos importantes, gracias. Además de convertirse en una de las fuentes de motivación para mantener la tenacidad y perseverancia, ha sido un ejemplo valioso a seguir.

Al grupo de Coordinación de Trasplantes por su colaboración en la consecución de tejidos y bases de datos anónimos fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Al grupo de anestesiólogos y de enfermería de quirófanos de Cirugía Hepática del Hospital Clínic, por su amabilidad a la hora de tomar los hígados resecados y las muestras de sangre para dar los pasos siguientes indicados para la creación de banco de tejidos para llevar a cabo la investigación.

A La Dra. Rosa Miquel y demás patólogos del Hospital Clinic de Barcelona por su amabilidad a la hora de entregarme los tejidos hepáticos para el banco de tejidos del departamento, los cuales fueron fundamentales para llevar a cabo la investigación. A las Sras. Nuria y Dolores en el departamento de Crio preservación de tejidos por su amabilidad a la hora de guardar y tomar muestras para la investigación.

A Rolando Ortega (mi cuñado) por tu acompañamiento y apoyo inigualable, al Dr. Josep Martí, al Dr. Rogelio Méndez, al Dr. Sam Lee por su apoyo en el desarrollo de los artículos y tesis doctoral.

Gracias a Eladio Gil (siempre llevo presente tu apoyo), Anthon Gavriel Stolairencó, Jairo Hoyos Campiño, Antonio Segovia, Milagro Canales, Dr. Gervasi, Lina Cuellar,

Dulce, Milton Arango, Julián H, Marcelo Caetano, Cucurel, Jaime Pla, María Ángeles Casas y Margarita por su apoyo incondicional. Gracias a Jessica Vallejo Hernández, Manuela Hernández y familia, mis amigos y una fuerte motivación para continuar buscando respuestas por medio de la investigación.

A mis amigos Dr. Benarroch (QEPD), Luisa Lanza, Nicky Van Berckel, Fermín Del Campo, María Ángeles López Rodríguez, quienes han sido mis amigos y un apoyo importante en todo este paso. Mis amigos siempre.

También agradezco a todos los miembros del Servicio de Cirugía General del Hospital Clínic por su contribución en mi evolución profesional a lo largo de este tiempo.

## **ABREVIATURAS:**

**Ac ANTI-EGFR:** ANTICUERPO ANTI FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL.

**Ac ANTI-VEGF:** ANTICUERPO ANTI FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASVULAR.

**AH:** ARTERIA HEPÁTICA

**ALPPS:** HEPATECTOMIA EN DOS TIEMPOS MODIFICADA ASOCIADA A SECCIÓN HEPÁTICA Y LIGADURA DE VENA PORTA.

**CEA:** ANTIGENO CARCINO EMBRIONARIO

**CMS:** SUBTIPO MOLECULAR CONSENSUAL DE CANCER COLO-RECTAL

**CCR:** CANCER COLO-RECTAL

**CV:** COEFICIENTE DE MAXIMA VARIACIÓN

**Da:** DALTONS.

**2D:** BIDIMENSIONAL

**3D:** TRIDIMENSIONAL

**LC-MS:** METODO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADO A ESPECTOMETRO DE MASA.

**LITT:** TERMOTERAPIA INTERSTICIAL INDUCIDA POR LASER.

**NMP:** PROTEINAS NUCLEARES DE LA MATRIZ

**MALDI-TOF:** DESORCIÓN/IONIZACIÓN POR LASER (MATRIZ SÓLIDA)- (TOF) COMO ANALIADOR DE MASA DEPENDIENDO DE TIEMPO DE VUELO QUE DEPENDE DEL PESO MOLECULAR.

**MHCR:** METASTASIS HEPATICAS DE ORIGEN COLO-RECTAL

**MS:** ESPECTROMETRIA DE MASA.

**m/z:** Peso Molecular

**MS-TC:** TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTARIZADA MULTICORTE

**MRI:** IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA.

**PET:** TOMOGRAFIA POR EMISIÓN DE POSITRONES.

**PTEN:** TENSINA EN EL CROMOSOMA 10

**RO:** RESECCIÓN TUMORAL TOTAL

**RFA:** ABLACIÓN POR RADIOFRECUENCIA.

**RH:** REMANENTE HEPÁTICO.

**RH/PCT:** VOLUMEN PROMEDIO DE REMANENTE HEPÁTICO DESPUES DEL PRIMER TIEMPO QUIRÚRGICO EN LA RESECCIÓN HEPÁTICA TIPO ALPPS.

**RH/PHT:** VOLUMEN PROMEDIO DE REMANENTE HEPÁTICO DESPUES DEL SEGUNDO TIEMPO QUIRÚRGICO EN LA RESECCIÓN HEPÁTICA TIPO ALPPS.

**RM:** RESONANCIA MAGNÉTICA.

**RM (Di-s-EOB-DTPA):** RESONANCIA MAGNÉTICA CON ÁCIDO GADOLINIO-ETOXIBENCIL-DIETILENTRIAMINO PENTA ACÉTICO.

**RM (DWI):** DIAGNÓSTICO DE DIFUSIÓN PONDERADA POR RESONANCIA MAGNÉTICA.

**SELDI-TOF:** DESORCIÓN/IONIZACIÓN POR LASER (MATRIZ MEJORADA)-(TOF) COMO ANALIADOR DE MASA DEPENDIENDO DE TIEMPO DE VUELO QUE DEPENDE DEL PESO MOLECULAR.

**SLP:** SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN

**SG:** SUPERVIVENCIA GLOBAL.

**US:** ULTRASONOGRAFÍA

**US-TC:** METODO DE FUSIÓN ULTRASONOGRAFÍA/TOMOGRAFÍA AXIAL COMPUTARIZADA.

**TERT:** TELOMERASA REVERSA TRANSCRIPTASA.

**TRFM:** MELANOTRANSFERRIN EN PLASMA

**VP:** VENA PORTA

**VH:** VENA HEPÁTICA

**μA:** MICRO AMPERIOS

## INDICE DE CONTENIDOS

---

---



## ÍNDICE

<b>1. SUMMARY</b> .....	<b>20</b>
<b>1.1. RESUMEN</b> .....	<b>23</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1. EPIDEMIOLOGÍA</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2. IMPLICACIONES CLÍNICAS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3. METODOS DIAGNÓSTICOS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.1. METODOS DIAGNÓSTICOS RADIOLÓGICOS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.2. MARCADORES</b> .....	<b>36</b>
<b>2.4. TRATAMIENTO</b> .....	<b>38</b>
<b>2.4.1. ESTRATEGIA QUIRÚRGICO</b> .....	<b>41</b>
<b>2.4.2. QUIMIOTERAPIA</b> .....	<b>44</b>
<b>2.4.2.1. QUIMIOTERAPIA PRE-QUIRÚRGICA</b> .....	<b>44</b>
<b>2.4.2.2. QUIMIOTERAPIA PERI-OPERATORIA</b> .....	<b>46</b>
<b>2.4.2.3. QUIMIOTERAPIA POST RESECCIÓN DE MHCR</b> .....	<b>47</b>
<b>2.4.2.4. QUIMIOTERAPIA Y DROGAS ANTIANGIOGÉNICAS</b> .....	<b>47</b>
<b>2.5. CLASIFICACIONES PRONÓSTICAS y FACTORES PRONÓSTICOS</b> .....	<b>51</b>
<b>2.5.1. INDICES PRONÓSTICOS</b> .....	<b>51</b>
<b>2.5.2. EL PAPEL DE LOS MARCADORES TUMORALES EN CASOS DE MHCR</b> .....	<b>53</b>
<b>2.5.3. ESTADO DEL ARTE ACTUAL EN EL CAMPO DE LA INVESTIGACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES PRONÓSTICOS</b> .....	<b>54</b>
<b>3. PERSPECTIVAS FUTURAS (PROTEOMICA GENOMICA Y BIOMARCADORES) ...</b>	<b>57</b>
<b>3.1. PROTEÓMICA</b> .....	<b>58</b>
<b>3.1.1. PROTEÍNA</b> .....	<b>61</b>
<b>3.1.2. PROTEOMA</b> .....	<b>64</b>
<b>3.1.3. SELECCIÓN DE TÉCNICA PARA ESTUDIO PROTEÓMICO</b> .....	<b>66</b>
<b>3.1.3.1. TÉCNICAS DE SEPARACION DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>66</b>
<b>3.1.3.1.1 TÉCNICAS POR ELECTROFORESIS</b> .....	<b>66</b>
<b>3.1.3.1.2 TÉCNICAS POR CROMATOGRAFÍA</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1.3.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1.3.3. MÉTODOS DE ANALISIS DE PROTEINAS</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1.3.3.1. ANALIZADORES DE MASA</b> .....	<b>69</b>
<b>3.1.3.3.2. DETECTORES</b> .....	<b>69</b>
<b>3.1.3.4. ANÁLISIS DE DATOS</b> .....	<b>69</b>
<b>3.1.4. TÉCNICA SELDI-TOF/MS</b> .....	<b>71</b>
<b>4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	<b>76</b>
<b>5. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>79</b>
<b>5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO</b> .....	<b>80</b>
<b>5.2. RECURSOS</b> .....	<b>81</b>
<b>5.3. DATOS DE LOS PACIENTES</b> .....	<b>81</b>
<b>5.4. MUESTRAS DE TEJIDO PARA EL ESTUDIO DE PROTEÓMICA</b> .....	<b>82</b>
<b>5.5. PROCEDIMIENTOS EN ESTUDIO PILOTO</b> .....	<b>83</b>

5.5.1.	CORTE Y PESO DE TEJIDO TUMORAL HEPÁTICO CONGELADOS .....	83
5.5.2.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	85
5.5.2.1.	HOMOGENIZACIÓN (PREPARACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO) .....	85
5.5.2.2.	OPTIMIZACIÓN (SELECCIÓN DE FRACCIONES DE PROTEÍNAS DEL TEJIDO HOMOGENIZADO) .....	86
5.5.2.3.	PREPARACION DE LA MEMBRANA CROMATOGRAFICA DE LOS SPOTS EN ARRAYS SELECCIONADOS (CM10 E IMAC30) .....	86
5.5.2.4.	PREPARACIÓN DE LA MATRIZ CON MOLÉCULAS ABSORBENTES DE ENERGÍA (E.A.M.) .....	87
5.5.2.5.	PREPARACIÓN DE MEZCLAS DE PROTEÍNAS ESTÁNDAR PARA CALIBRAREL SELDI TOF/MS .....	87
5.5.2.6.	PASO DE MUESTRAS DE TEJIDO HOMOGENEIZADO A LOS BIOPROCESADORES Y LAVADO .....	88
5.5.2.7.	TRATAMIENTO CON SOLUCIÓN DE E.A.M. (Moléculas Absorbentes de Energía o matriz) .....	88
5.5.3.	LECTURA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SU PESO MOLECULAR EN DALTONS Y LAS CONCENTRACIONES INTERPRETADAS POR PICOS POR CADA NIVEL DE CONCENTRACION .....	89
5.5.4.	ANALISIS ESTADISTICO DE ESTUDIO PILOTO .....	91
5.6	ESTUDIO PARA VALIDACIÓN .....	91
5.6.1.	PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS DEL ESTUDIO PARA VALIDACIÓN	91.
5.6.2.	EL DISEÑO DEL ESTUDIO .....	92
5.6.3.	RESECCIÓN DE METÁSTASIS HEPÁTICA DE CÁNCER COLORRECTAL Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....	93
5.6.4.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA HEPÁTICA Y FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS A PARTIR DE HOMOGENADOS HEPÁTICOS .....	93
5.6.5.	PROCESAMIENTO PROTEÓMICO DE MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO .....	94
5.6.6.	ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS .....	95
5.6.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	95
6.-	RESULTADOS .....	97
6.1.	RESULTADOS DE ESTUDIO PILOTO .....	98
	ARTICULO 1º .....	105
6.2.	RESULTADO DE ESTUDIO PARA VALIDACIÓN .....	113
	ARTICULO 2º .....	117
7.-	DISCUSIÓN .....	125
8.-	CONCLUSIONES .....	139
9.-	BIBLIOGRAFIA .....	143

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Factores clínicos predictores de recurrencia en casos de MHCR .....	52
<b>Tabla 2.</b>	Supervivencia relacionada con Índices de criterios pronósticos de FONG .....	52
<b>Tabla 3a.</b>	Referencias estudios genéticos en CCR .....	55
<b>Tabla 3b.</b>	Referencias estudios proteómicos en CCR .....	56
<b>Tabla 4.</b>	Características de los casos incluidos en el estudio .....	81
<b>Tabla 5.</b>	Base de datos de pacientes seleccionados para el estudio (casos leves) .....	82
<b>Tabla 6.</b>	Base de datos de pacientes seleccionados para el estudio (casos severos) .....	82
<b>Tabla 7.</b>	RESULTADOS: Picos estadísticamente significativos que discriminan la severidad en el comportamiento de las MHCR .....	100
<b>Tabla 8.</b>	RESULTADOS: Picos estadísticamente significativos que discriminan a los casos sanos de los casos de pacientes enfermos con MHCR .....	101

## RESUMEN

---

---

## 1 SUMMARY

Colorectal cancer (CCR) is a major public health problem, being the third most common cancer and the fourth leading cause of cancer death in the world (1).

In recent years, an incidence of 446,800 new cancers has been reported in Europe, accounting for approximately 11% of all cancers in Spain and 9% of all cancers in the United States (2, 3, 4, 5). In the United States the three most frequent cancers among men are prostate (43%), colorectal (9%) and melanoma (7%), and among women, breast (41%), uterine (8%) and colorectal (8%) (6).

Countries with the largest reductions in CCR mortality are characterized by improved accessibility to screening services, especially endoscopic screening and specialized care. A large proportion of the disparities can be attributed to socioeconomic status (1, 7, 8).

There is a tendency for growth of CCR worldwide, a tendency that is projected to persist until 2035 and probably beyond (9). CCR incidence and mortality patterns and trends correlate with current levels of human development and its incremental changes reflected in the adoption of more Western lifestyles (10)

Up to 77% of CCR patients develop hepatic metastases from CCR (MHCR) during follow-up, with MHCR being the main cause of mortality in these patients (11). Approximately 25% of MHCRs appear within the first year of the initial diagnosis of CCR (synchronous metastases), and after surgical resection of the primary CCR, 50-75% of patients have liver metastases or recurrence of metastatic disease within the next three years (11). Less than 20% of patients with MHCR are surgically resectable at the time of diagnosis (11, 12, 13, 14).

There is a subset of patients with hepatic metastases, both synchronous and metachronous, who may benefit from radical surgery and possibly even achieve cure (11). In fact, 25-50% of surgically resected MHCR patients today can survive five or more years after surgery (11). Up to 75% of patients with resected MHCR will experience recurrence, in the majority of cases only in the liver (11).

Classically the prognosis of patients with MHCR has been estimated based on clinical prognostic indexes such as the Fong and Nordlinger criteris (15,16). However, these prognostic scores are currently limited and considered suboptimal when assessing the ideal treatment for each patient with MHCR according to their individual characteristics (17, 18).

Liver resection is the most effective treatment for long-term survival and the only treatment that offers the possibility of cure in patients with CCR and liver metastases (19, 20). According to current evidence, the following points are considered fundamental to be taken into account when selecting the ideal treatment for each case of MHCR:

- (1) The primary goal is to achieve cure or long disease-free survival after resection.
- (2) Evaluation of resectability should be performed with high quality imaging studies.

(3) Regimens include dual or triple agent chemotherapy regimens with optimal combinations enhancing their effectiveness with the integration of current treatments such as cytotoxic and anti-angiogenic drugs. For the adequate selection of an ideal treatment it is essential to find biomarkers that guide a more exact selection of the ideal therapy for each specific case.

(4) It is important to use prognostic criteria for the evaluation of response in solid tumors after first-line chemotherapy. In the same way, use criteria for the evaluation of morphological changes related to treatment response to antiangiogenic agents and agents involved in tumor cell growth.

(5) The duration of chemotherapy should be as short as possible (taking into account the potential hepatotoxicity due to chemotherapy in the remaining healthy liver). Optimal surgical resection (R0) (with tumor-free resection margins) should be performed as soon as technically possible thus preventing the progression of the tumor. The results of survival and healing depend on the timely, adequate and effective treatment of cancer.

(6) Due to the heterogeneity in the behavior of the MHCR, in all cases it is essential to establish a multidisciplinary treatment with experts to improve clinical outcomes and patient survival.

(7) The number of metastases or patient's age should not be an absolute contraindication for surgery combined with chemotherapy (5, 20, 21).

MHCR is a disease of heterogeneous behavior as a consequence of molecular differences in primary tumor tissue and metastasis. The mechanisms underlying this process are largely unknown. Recent studies have shown differences in the molecular architecture of the metastatic lesion compared to the primary tumor; however, the systematic analysis of alterations within the signaling network of the activated proteins in the MHCR tissue remains unclarified. Therefore, it would be useful to find characteristic features of hepatic metastatic CCR tissue that can more accurately predict neoplastic survival and recurrence following resection of MHCR (19, 21). In recent years, proteomics has played an important role in the identification of tumor biomarkers associated with many pathologies. These biomarkers guide the prognosis of the disease in each specific case, orient towards the ideal treatment for each patient, and aid the understanding of pathophysiology and disease origin (22, 23).

1.2. HYPOTHESIS: 1) There exists a specific proteomic profile in the tumor tissue of patients with MHCR. 2) Such a proteomic profile will be able to predict the clinical behavior of the disease.

1.3. PRINCIPAL OBJECTIVE: To identify specific proteomic profiles that may be predictive of a particular clinical behavior of the disease in patients with MHCR.

1 a.- To establish a comparison between the proteomic profiles of controls and patients with MHCR

1 b.- Find a correlation between the expression of a panel of proteins and the aggressiveness of the tumor according to the Fong prognostic criteria.

#### 1.4. SECONDARY OBJECTIVE:

Develop predictive markers / prognosis of liver metastases for recurrence after hepatic resection; not only guided by clinical parameters, but also by molecular markers involved in the process of liver metastasis.

1.5. METHODOLOGY USED: A control group consisting of 10 healthy patients and a group of 20 patients with MHCR treated surgically with curative intention and with a known clinical behavior of the disease were included in the study. In the control group, healthy liver tissue was used and the hepatic tumor tissue, both cryopreserved, was used in the MHCR group. The process of tissue homogenization for the extraction of proteins is performed. These resulting extracts are fractionated by ion exchange chromatography and analyzed by SELDI-TOF / MS.

1.6. EXPECTED RESULTS: It is expected to find specific proteomic profiles that differ from the healthy subjects and patients with MHCR and within these patients those with a good or poor prognosis.

1.7. RESULTS OBTAINED: The expression of 21 proteins showing the differences between the MHCR groups and values with significant p values were detected. A protein peak located in m / z with 7373 D was identified which showed a clear difference between the MHCR group and the control group (P <0.0001). We generated a classification tree of 4 nodes and were able to distinguish controls, patients with mild prognosis and severe prognosis by combining the peaks located in 2970, 2871, 7929 Daltons, obtaining a ROC curve of 0.994, 0.947 And 0.952 respectively. The sensitivity of the algorithm was 100% and the specificity was 90%; the classification tree was obtained by combining 2 different protein peaks. The first protein was found at 2970 m / z (P <0.051) useful for differentiating patients with aggressive liver metastases with less aggressive liver metastases.

CONCLUSIONS: To obtain the objectives in this research were studied a total of 10 healthy hepatic tissues and 105 MHCR tissues, 20 in the first study and 85 in the study for validation. In this groups have been demonstrated that exists a specific protein profile in the hepatic tumor tissue of patients with MHCR. This proteomic profile is useful for predicting the clinical behavior of these patients, therefore it can also guide towards the best treatment in each case with MHCR. The analysis of protein profiles in the tissue by the SELDI-TOF / MS system is a useful tool for the identification of new biomarkers in patients with MHCR.

## 1 RESUMEN

El Cáncer colorectal (CCR) es un importante problema de salud pública, siendo el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado y la cuarta causa de muerte por cáncer en todo el mundo (1).

En los últimos años ha sido comunicado en Europa una incidencia de 446,800 nuevos cánceres, representando aproximadamente el 11% de todos los cánceres en España y el 9% de todos los cánceres en Estados Unidos (2, 3, 4, 5). En Estados Unidos los tres cánceres más frecuentes entre los hombres son el de próstata (43%), el CCR (9%) y el melanoma (7%), y entre las mujeres el cáncer de mama (41%), el de cuerpo uterino (8%) y el CCR (8%) (6)

Los países con las mayores reducciones en la mortalidad por CCR se caracterizan por una mejor accesibilidad a la detección, especialmente el cribado endoscópico y la atención especializada. Una gran proporción de las disparidades puede atribuirse al estatus socioeconómico (1,7, 8).

Existe una tendencia al crecimiento de la tasa de CCR a nivel mundial, presencia que persistirá probablemente más allá del año 2035 (9). La incidencia y la mortalidad en el CCR se correlacionan con los niveles actuales de desarrollo humano y sus cambios en la adopción de estilos de vida más occidentales (10).

Hasta un 77% de los pacientes con CCR desarrollan metástasis hepáticas durante el seguimiento, y son la principal causa de mortalidad en estos pacientes (11). Cerca de un 25% de las metástasis hepáticas por Cáncer colorectal (MHCR) aparecen dentro del primer año del diagnóstico inicial del CCR (metástasis sincrónicas) y después de la resección quirúrgica del CCR primario. El 50%-75% de los pacientes presentan metástasis hepáticas o recidiva de la enfermedad metastásica dentro de los tres años siguientes (11). Menos del 20 % de pacientes con MHCR son quirúrgicamente resecables en el momento del diagnóstico (11, 12, 13, 14).

Hay un subconjunto de pacientes con metástasis hepáticas, tanto sincrónicas como metacrónicas, que pueden beneficiarse de la cirugía radical y posiblemente incluso lograr la curación (11). En la actualidad,



entre el 25% al 50% de los pacientes con MHCR resecadas quirúrgicamente sobreviven cinco o más años después de la cirugía (11). Hasta el 75% de los pacientes con MHCR resecadas experimentarán recidiva sólo a nivel hepático (11).

Clásicamente el pronóstico de los pacientes con MHCR se ha estimado en base a factores e índices pronósticos clínicos como los Criterios de Fong y Norldinger (15, 16). Sin embargo, actualmente estas puntuaciones pronosticas presentan limitaciones y se consideran subóptimas a la hora de evaluar cuál sería el tratamiento ideal para cada paciente con MHCR según las características de su caso (17, 18).

La resección hepática es el único tratamiento que ofrece la posibilidad de curación en pacientes con CCR y metástasis hepáticas (19, 20). De acuerdo con la evidencia actual, los siguientes puntos son considerados fundamentales para ser tenidos en cuenta en el momento de la selección del tratamiento ideal para cada caso de MHCR:

- (1) El objetivo principal es lograr la curación o una larga supervivencia libre de enfermedad después de la resección.
- (2) La evaluación de la resecabilidad se debe realizar con estudios de imágenes de alta calidad.
- (3) El uso de esquemas de quimioterapia de doble o triple regímenes con combinaciones óptimas potenciando su eficacia con la integración de tratamientos actuales como las drogas citotóxicas y anti-angiogénicas. Para la adecuada selección de un tratamiento ideal es esencial el hallazgo de biomarcadores que guíen a una más exacta selección de la terapia ideal para cada caso específico.
- (4) Es importante hacer uso de Criterios pronósticos de evaluación de respuesta en tumores sólidos posterior a la quimioterapia de primera línea. De la misma manera hacer uso de criterios para evaluación de los cambios morfológicos relacionados con la respuesta al tratamiento con agentes antiangiogénicos y agentes que intervienen en el crecimiento celular tumoral.

(5) La duración de la quimioterapia debe ser tan corta como sea posible (teniendo en cuenta la potencial hepatotoxicidad por quimioterapia en el hígado sano remanente). La resección quirúrgica óptima (R0) (con márgenes de resección libre de tumor) debe ser realizada tan pronto como sea técnicamente posible evitando así la progresión del tumor. Los resultados de supervivencia y curación dependerán de lo oportuno, adecuado y eficaces que sean el tratamiento oncológico y quirúrgico.

(6) Debido a la heterogeneidad en el comportamiento de las MHCR, en todos los casos es fundamental establecer un tratamiento multidisciplinario con expertos para mejorar los resultados clínicos y la supervivencia en los pacientes.

(7) El número de metástasis o edad del paciente no debe ser una contraindicación absoluta para la cirugía combinada con quimioterapia (5, 20, 21).

Las MHCR son una enfermedad de comportamiento heterogéneo como consecuencia de las diferencias a nivel molecular del tejido tumoral primario y de la metástasis. Los mecanismos que subyacen en este proceso son, en gran parte, aún desconocidos. Estudios recientes han mostrado diferencias en la arquitectura molecular de la lesión metastásica en comparación con el tumor primario, sin embargo, no se ha descrito el análisis sistémico de las alteraciones dentro de la red de señalización de las proteínas activadas en el tejido de las MHCR. Por tanto, sería útil encontrar factores característicos específicos del tejido metastásico hepático del CCR que puedan predecir con mayor precisión la supervivencia y recidiva neoplásica tras la resección de las MHCR (19, 21).

En los últimos años la proteómica ha jugado un papel importante en la identificación de biomarcadores tumorales asociados a muchas patologías. Estos biomarcadores orientan acerca del pronóstico de la enfermedad en cada caso específico, informan hacia el tratamiento ideal para cada paciente y al entendimiento de la fisiopatología desde el origen de la enfermedad (22, 23).

**1.2. HIPOTESIS:** 1) Existe un perfil proteómico específico en el tejido tumoral de los pacientes con MHCR. 2) Dicho perfil proteómico es capaz de predecir el comportamiento clínico de la enfermedad.

Para contestar a esta hipótesis nos hemos marcado los siguientes objetivos:

**1.3. OBJETIVO PRINCIPAL:** Identificar perfiles proteómicos específicos que puedan ser predictivos de un determinado comportamiento clínico de la enfermedad en pacientes con MHCR.

1a.- Establecer una comparación entre los perfiles proteómicos de casos sanos y casos de enfermos con MHCR

2b.- Encontrar una correlación entre la expresión de un panel de proteínas y la agresividad del tumor de acuerdo con los criterios pronósticos de Fong.

**1.4. OBJETIVO SECUNDARIO:** Desarrollar marcadores predictivos / pronósticos de metástasis hepáticas para la recidiva después de la resección hepática; no sólo guiados por los parámetros clínicos, sino también por marcadores moleculares implicados en el proceso de la metástasis hepática.

**1.5. METODOLOGIA EMPLEADA:** Se incluyen en el estudio un grupo control formado por 10 pacientes sanos y un grupo de 20 pacientes con MHCR tratadas quirúrgicamente con intención curativa y con un comportamiento clínico de la enfermedad conocido. En el grupo control se utiliza tejido hepático sano y en el grupo de MHCR se utiliza tejido tumoral hepático, ambos criopreservados. Se realiza proceso de homogenización del tejido para extracción de proteínas. Estos extractos resultantes se fraccionan por cromatografía de intercambio iónico y se analizan por SELDI-TOF/MS.

**1.6. RESULTADOS ESPERADOS:** Se espera encontrar perfiles proteómicos específicos que diferencien a los sujetos sanos de pacientes con MHCR y dentro de estos pacientes los de buen o mal pronóstico.

**1.7. RESULTADOS OBTENIDOS:** Han sido detectadas la expresión de 21 proteínas que mostraron diferencias entre los grupos MHCR graves y leves con valores de p significativos. Se identificó un pico de proteína localizado

en m/z con 7373 D. (Dalton) que mostró una clara diferencia entre el grupo MHCR y el grupo control ( $P < 0,0001$ ). Se generó un árbol de clasificación de 4 nodos que fue capaz de distinguir el grupo control, los pacientes con pronóstico leve y pronóstico grave por la combinación de los picos situados a m/z 2970, 2871, 7929 Dalton, obteniendo una curva ROC de 0,994, 0,947 y 0,952 respectivamente. La sensibilidad del algoritmo fue del 100 % y la especificidad fue del 90 %. El árbol de clasificación se obtuvo combinando 2 picos de proteínas diferentes. La primera proteína a considerar se la encuentra en 2970 m / z ( $P < 0,051$ ) útil para separar a los pacientes leves de los graves.

**1.8. CONCLUSIONES:** Para obtener los objetivos planteados en esta tesis se han estudiado un total de 10 tejidos hepáticos sanos y 105 tejidos de MHCR, 20 en el estudio piloto y 85 en el estudio para validación. En este grupo de casos estudiados se demostró que existe un perfil proteómico específico en el tejido hepático tumoral de los pacientes con MHCR. Este perfil proteómico si es capaz de predecir el comportamiento clínico de estos pacientes, por lo tanto, también puede orientar hacia el mejor tratamiento en cada uno de los casos con MHCR. El análisis de los perfiles proteómicos en tejido hepático por el sistema SELDI-TOF/MS, es una herramienta útil para la identificación de nuevos biomarcadores en pacientes con MHCR.



## INTRODUCCION

---

---

## **2. INTRODUCCION**

### **METASTASIS HEPATICAS POR CANCER COLO-RECTAL (MHCR) ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL**

#### **2.1. EPIDEMIOLOGIA**

El cáncer colorectal (CCR) es un importante problema de salud al ser el tercer cáncer más común a nivel mundial, el segundo en frecuencia en el sexo masculino seguido del cáncer de pulmón y el tercero en frecuencia en mujeres después del cáncer de mama y el cáncer de pulmón (3). Es la segunda causa de muerte por cáncer después del cáncer de pulmón; existe alrededor de un millón a 1 millón 400 mil nuevos casos de CCR y 500.000 a 693.900 muertes al año en el mundo. En Europa ha sido comunicada una incidencia de 446,800 nuevos casos de CCR y una mortalidad de 214,700 por CCR en el año 2012, siendo el 13% de todos los cánceres y ocupando el segundo lugar en frecuencia global después del cáncer de mama. Representa el 13,2% y el 12,7% de todos los casos de cáncer en hombres y mujeres, respectivamente y ha sido la causa de muertes por cáncer en el 11,6% y 13,0% en hombres y mujeres, respectivamente (3, 7).

En España han sido comunicados unos 192.6 nuevos casos de CCR en hombres y 129.8 en mujeres por 100.000 habitantes entre los años 2010 y 2013 representando el 11% de todos los cánceres en España. En Japón 62.4 casos de CCR en hombres por 100,000 hombres y 37.2 casos de CCR en mujeres por cada 100,000 mujeres. (2, 3, 7).

El CCR representa el 9% de todos los cánceres en Estados Unidos, los tres cánceres más frecuentes entre los hombres en los Estados Unidos son la próstata (43%), el CCR (9%) y el melanoma (7%), y en las mujeres son el cáncer de mama (41%), cuerpo uterino (8%) y CCR (8%) (2, 3, 4, 5, 6). En Estados Unidos han sido comunicados 142.820 nuevos casos de CCR durante el año 2013 (9% de todos los cánceres) y una mortalidad de 52.830 pacientes durante el año 2013 (9% de mortalidad por cáncer). Habitualmente la causa de muerte en CCR es por la aparición de metástasis. (4, 5, 24, 25, 26, 27).

En el transcurso de los últimos 40 años, ha existido una gran disparidad en la incidencia de mortalidad por CCR entre los países europeos, así como en la incidencia entre hombres y mujeres y los diferentes grupos de edad entre las distintas áreas geográficas debido a la exposición variable a los distintos factores de riesgo, la capacidad para hacer una detección temprana del cáncer y el acceso al tratamiento adecuado. Los países con las mayores reducciones en la mortalidad por CCR se caracterizan por una mejor detección, especialmente el cribado endoscópico y la atención especializada. Una gran proporción de las disparidades puede atribuirse al estatus socio económico (1, 8).

Existe una tendencia al crecimiento de la tasa de CCR a nivel mundial, tendencia que persistirá más allá del año 2035 (9). Los patrones y tendencias de la incidencia y la mortalidad en el CCR se correlacionan con los niveles actuales de desarrollo humano y los cambios en la adopción de estilos de vida más occidentales (10).

El aumento en la incidencia global del CCR no es uniforme, con variaciones significativas influenciadas por la ubicación geográfica, la situación socioeconómica, la edad y el género. Aunque la región europea tiene la incidencia más alta, Asia como continente continúa llevando la carga más pesada de la enfermedad. Aunque la incidencia de la enfermedad es mayor en las regiones más desarrolladas, la mortalidad es considerablemente mayor en las regiones menos desarrolladas y esta brecha se ampliará en las próximas dos décadas. (9).

Después de la cirugía los pacientes con CCR tienen un alto riesgo de recidiva del cáncer. Este riesgo es mayor en pacientes con enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes y la Enfermedad cardiovascular. Los riesgos elevados pueden estar asociados con factores clínicos o genéticos, pero también a factores del estilo de vida tales como dieta, actividad física y sobrepeso u obesidad. El aumento de la actividad física y una dieta saludable después del diagnóstico se han asociado con un menor riesgo de recidiva y mortalidad por cáncer y una mejor calidad de vida. La Fundación Mundial para la Investigación del Cáncer / Instituto Americano de Investigación del Cáncer (WCRF / AICR) publicaron unas recomendaciones



acerca de la dieta, la actividad física y el peso corporal que pueden disminuir los riesgos de recidiva del cáncer y enfermedades crónicas (9). La adhesión a estas recomendaciones puede reducir el riesgo de recidiva y muerte por CCR (9).

El Hígado es el órgano diana para la aparición de metástasis por CCR (28, 29) siendo la principal causa de mortalidad (28, 30). Hasta el 77 % de los pacientes con CCR desarrollarán metástasis hepáticas colorectales (MHCR) durante el seguimiento de su enfermedad (11). Entre el 10-25% de pacientes, las metástasis se diagnostican en el momento de la resección del tumor primario (metástasis sincrónicas). La tasa de supervivencia global a 5 años en estos casos está entre un 30% y 60% con los tratamientos actuales (2, 11, 19, 20, 21, 25, 31, 32, 33, 34). En la actualidad entre un 20-35% de pacientes con metástasis hepáticas son quirúrgicamente resecables en el momento del diagnóstico (11, 13, 25).

La cirugía es el único tratamiento para las MHCR que ha demostrado ser curativo mientras que otros como la quimioterapia o la radiofrecuencia, sólo han mostrado discretos aumentos en la supervivencia libre de recidiva en relación a la abstención (5, 12, 19, 20, 21). Los avances en las técnicas quirúrgicas, el uso de terapias neo-adyuvantes más efectivas y las mejoras en los cuidados peroperatorios han ampliado los criterios para indicar la cirugía con intención curativa, aumentando así el número de pacientes susceptibles de recibir una resección completa (R0) de sus MHCR (31). Sin embargo, el pronóstico de los pacientes con MHCR es aún pobre y en los casos tratados con resección R0 de las MHCR, la supervivencia global a 5 años se sitúa entre un 30% y un 60% (2, 12, 19, 31) debido a que uno de los principales problemas en la cirugía de resección es la alta tasa de recidiva (11, 13).

Las posibles causas de la alta tasa de recidivas son debidas entre otras a la afectación de los márgenes de resección quirúrgica, las metástasis en los ganglios linfáticos, la invasión de los conductos biliares debidos principalmente al crecimiento del tumor intra-luminal y la invasión vascular (33, 34, 35). Asimismo, la presencia de micro-metástasis

residuales y de células tumorales circulantes se considera la causa principal de la recidiva tumoral después de una resección quirúrgica (33).

La variación de las tasas de supervivencia a 5 años es el resultado de la diferencia en la selección de pacientes, criterios de resecabilidad, el uso de la quimioterapia adyuvante, el uso de anticuerpos específicos para VEGF y la experiencia quirúrgica (32). Sin embargo, en los últimos años, la mayoría de los estudios se han centrado en la supervivencia global (SG) o supervivencia libre de progresión (SLP) después de metastasectomía, independientemente del estado de la enfermedad en el momento del diagnóstico (32, 36).

Clásicamente el pronóstico de los pacientes con MHCR se ha estimado en base a factores e índices pronósticos clínicos como los Criterios de Fong y Norldlinger (15, 16). Estos índices provienen de series históricas retrospectivas basadas en datos clínicos y patológicos y predicen la recidiva y la supervivencia de los pacientes con MHCR tras su resección, por lo que son útiles para seleccionar los pacientes que tendrán un mejor resultado tras la resección quirúrgica e indicar otras modalidades de tratamiento en los pacientes de mal pronóstico (15, 16). Sin embargo, debido a las mejoras que se han producido durante estos años en el tratamiento quirúrgico y adyuvante de las MHCR, estos índices pronósticos pueden tener actualmente una sensibilidad y especificidad sub-óptimas a la hora de evaluar cuál sería el tratamiento ideal para cada paciente con MHCR según las características de su caso (17, 18, 31). Una de las estrategias para mejorar la fiabilidad pronóstica en los pacientes con MHCR es el uso de biomarcadores que, de forma independiente o asociados a los índices pronósticos clásicos, predecirían la evolución neoplásica en el paciente tras la resección quirúrgica de las MHCR (18, 37). En este sentido, los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de nuevas técnicas bioquímicas como la proteómica, aumentando así la capacidad de detectar nuevos biomarcadores asociadas a la enfermedad neoplásica (37).

La proteómica se define como el estudio del proteoma (conjunto de proteínas expresadas en una célula particular bajo condiciones de medio ambiente y etapa de desarrollo específicas), lo que permite obtener perfiles

de expresión de las proteínas en suero, tejido u otras sustancias biológicas y analizar la cantidad, estructura, función y regulación de la expresión proteica a través de dichos perfiles (22).

## **2.2. IMPLICACIONES CLÍNICAS:**

El hígado es el órgano que recibe el drenaje más importante de sangre venosa desde el tracto gastrointestinal. Las células cancerosas llegan al hígado por vía sanguínea, por lo tanto, tienen una alta probabilidad de llegar a los sinusoides hepáticos. Esta es la razón principal por la cual el hígado es el órgano más común como diana de metástasis a distancia desde la lesión maligna primaria color rectal (38).

Dos tercios de los pacientes con MHCR morirán por causa de las Metástasis hepáticas (24).

Hay un subconjunto de pacientes con metástasis hepáticas, tanto sincrónicas como metacrónicas, que pueden beneficiarse de la cirugía radical y posiblemente incluso lograr la curación (11). De hecho, del 25% al 50% de los pacientes con MHCR resecadas quirúrgicamente hoy en día pueden sobrevivir cinco o más años después de la cirugía (11). Hasta un 75% de los pacientes con MHCR resecada experimentarán recidiva en la mayoría de los casos sólo a nivel hepático (11).

En la actualidad son en gran parte poco estudiados y desconocidos los mecanismos fisiopatológicos moleculares intracelulares de las MHCR que influyen en la invasión metastásica y progresión de las mismas (39). No se ha descrito un análisis sistémico de las alteraciones dentro de la red de señalización de las proteínas activadas dentro de las MHCR. Hay estudios recientes que muestran diferencias en la arquitectura molecular de las MHCR comparándolas con la del CCR primario (39, 40).

## **2.3. ETODOS DIAGNOSTICOS**

### **2.3.1 METODOS DIAGNOSTICOS RADIOLOGICOS**

El Ultrasonido es un método diagnostico básico en la evaluación inicial de lesiones hepáticas. (41).

Para maximizar la seguridad y la eficacia de la Resección quirúrgica de las MHCR se necesitan imágenes preoperatorias apropiadas. Los avances en la tomografía computarizada (TC), imágenes de resonancia magnética (MRI) y tomografía por emisión de positrones de fluorodeoxiglucosapositron (FDG-PET) han conducido a una mejor detección de lesiones ocultas y una mejor definición de la anatomía quirúrgica (42). El FDG-PET en combinación con la TAC es útil en el caso de pacientes con marcadores tumorales elevados (CEA) sin indicación del lugar de la recaída en la tomografía computarizada, en el seguimiento de los pacientes con CCR y es especialmente útil para caracterizar la extensión de la enfermedad metastásica y para buscar metástasis extra hepáticas cuando las metástasis son potencialmente resecables (42).

La Tomografía Axial Computarizada multicorte (MS-TC) es útil como una modalidad de detección inicial y en la planificación preoperatoria, para evaluar situaciones tales como la estimación volumétrica del tamaño del hígado remanente o en la definición de anatomía arterial preoperatoria. Si bien los avances tecnológicos han dado lugar a una calidad y claridad de imagen en MS-TC sin precedentes, esto no reemplaza la necesidad de un dedicado y competente radiólogo con experiencia en imagen hepática (42).

Se ha realizado una evaluación prospectiva del papel de la ecografía y la tomografía computarizada (TC) en busca de más precisión en la información ofrecida por las imágenes, lo que ha proporcionado métodos diagnósticos de fusión como (US-TC). Las experiencias en diagnóstico inicial de pequeñas lesiones hepáticas, muestran que el uso complementario de imágenes con US-TC puede tener valor en la estratificación de los pacientes con CCR, centrándose en los pacientes susceptibles de albergar lesiones hepáticas benignas y malignas o benignas coexistentes. Una mayor precisión y los cambios en la información de las lesiones puesto en escena con el uso de US más TC, conllevan cambios en el tratamiento clínico (41).

La Tomografía axial computarizada multicorte (MS-TC) aún tiene limitaciones en la valoración de lesiones hepáticas pequeñas. La Resonancia magnética ha sido un método diagnóstico complementario con alta

sensibilidad y especificidad en manos de radiólogos experimentados (42, 43)

En un estudio se comparan el rendimiento diagnóstico de difusión ponderada RM (DWI) con TC multicorte (MS-TC) en la detección y clasificación de las lesiones hepáticas focales en pacientes con CCR. La RM (DWI) fue significativamente superior al TAC multicorte (MS-CT) tanto en la evaluación de las lesiones como en la evaluación de los segmentos hepáticos, especialmente las lesiones menores de 10 mm se detectan mejor con RM (DWI) en comparación con MS-TC y el PET (42, 44); especialmente con la combinación de difusión de imágenes RM (DWI) y agentes de contraste específico de hepatocitos (42)

La RM (DWI) tuvo mayor sensibilidad y especificidad para la evaluación de los segmentos en la detección de lesiones hepáticas metastásicas y ha sido más preciso para determinar la extensión de la enfermedad metastásica en pacientes con CCR, por lo tanto, es de ayuda para optimizar la gestión terapéutica de los pacientes (44).

En la actualidad, la anatomía hepática segmentaria se puede identificar en imágenes a través de tomografía computarizada (TC) o imágenes de resonancia magnética. Aunque estas imágenes contienen toda la información requerida en tumores, vasos mayores y vías biliares, los cirujanos pueden tener dificultades para percibir las relaciones de estas estructuras antes de la cirugía durante la planificación quirúrgica. Es importante ofrecer a los cirujanos herramientas que faciliten la interpretación de las imágenes convencionales. Entre estas herramientas, la visualización 3D mostró ventajas significativas en comparación con la visualización estándar de cortes 2D (45).

### **2.3.2. MARCADORES**

A causa de la necesidad urgente para definir nuevas estrategias no invasivas en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas en general y en las MHCR, una de los campos de investigación más activos en los últimos 10 años es la investigación para mejorar las pruebas de imagen, así como marcadores séricos relacionados con el diagnóstico (46).

Pocos biomarcadores han sido introducidos en la práctica clínica para la atención de pacientes con CCR, incluyendo RAS, mutaciones BRAF, MSI y CIMP.

Se demostró una marcada inter conectividad entre seis sistemas de clasificación independientes que se agrupan en cuatro subtipos moleculares consensuales (CMS) de los cánceres colorectales, con características distintivas para cada subtipo molecular (47):

CMS1 (MSI Inmune, 14%), hipermutación, micro satélite inestable, fuerte activación inmune;

CMS2 (canónico, 37%), epitelial, cromosómicamente inestable, marcado WNT y MYC activación de señalización;

CMS3 (Metabólico, 13%), epitelial, disregulación metabólica evidente;

CMS4 (Mesenquimal, 23%), activación prominente del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , invasión estromal y angiogénesis.

Los subtipos CMS2, CMS3 Y CMS4 representan casi el 85% de las muestras primarias de CCR (47).

Las muestras con características mixtas (13%) posiblemente representan un fenotipo de transición o heterogeneidad intra-tumoral. Se consideró que los grupos de la CMS son el sistema de clasificación más robusta actualmente disponible para el CCR con clara interpretación biológica y la base para futuras estratificaciones clínicas y la identificación de subtipos determinados de intervenciones focalizadas. (46, 47).

Se identificaron 145 características de proteínas que se asociaron significativamente ( $P < 0,05$ ) con cada subtipo. Las muestras de CMS1 tenían una expresión elevada de proteínas implicadas en la apoptosis (Caspase 7, Rad51), el ciclo celular (Cyclins D1, E1, E2) y la reparación del daño del ADN (Chk1), mientras que las muestras de CMS4 se enriquecieron principalmente para las proteínas del microambiente (colágeno,

Fibronectina). En estudios proteómicos en 95 muestras tumorales de CCR, un total de 81 fueron asignadas a un grupo específico de los cuatro CMS identificados (47).

Es importante destacar que, aunque estos subtipos CMS en los pacientes con CCR tienen algunos marcadores genómicos y epigenómicos característicos. Sus asociaciones descritas aquí son débiles y no permiten aún la categorización de subtipos de expresión génica, reforzando la noción de que las firmas transcripcionales permiten refinar la sub- clasificación de la enfermedad más allá de lo que puede por los biomarcadores actualmente validados. Por ejemplo, los tumores de tipo RAS no mutados se consideran una entidad homogénea para las decisiones terapéuticas en el entorno avanzado, a pesar de que se encuentran a través de distintos subgrupos CMS con profundas diferencias biológicas, que se espera que se traduzcan en cada respuesta heterogénea a fármacos. (47).

Los niveles en sangre de antígeno carcinoembrionario (CEA) y técnicas de imagen se están utilizando para controlar la evolución de los pacientes con MHCR, pero el CEA no es específico y las Técnicas de imagen son costosas y no siempre están disponibles (48).

Aún en la actualidad no hay marcadores específicos de uso clínico para los casos de MHCR.

## **2.4. TRATAMIENTO**

La resección quirúrgica (R0) es el gold-estándar en el tratamiento para las MHCR. Entre el 10% y 25% de los pacientes son candidatos para la resección quirúrgica (R0) en el momento del diagnóstico de las MHCR. Los criterios de selección para una resección quirúrgica (R0) vienen dados básicamente por la extensión de las metástasis, el estado general del paciente y la posibilidad de dejar un remanente hepático adecuado (5, 49, 50). En las últimas dos décadas, la resección de metástasis hepáticas (R0) se ha convertido en una técnica de elección para mejorar la supervivencia en pacientes con cáncer de colon metastásico y en algunos casos, proporcionando una cura a largo plazo (42). Los pacientes con MHCR que

no reciben tratamiento alguno tienen una supervivencia menor a 12 meses sin supervivencia a 5 años (5, 20). De la misma manera ha surgido un marcado incremento en las opciones terapéuticas disponibles para los pacientes con MHCR en estadios avanzados e irresecables, lo cual ha contribuido al incremento de la supervivencia media de 12 meses hasta 30 meses aún sin una resección quirúrgica. Ha aumentado también el número de pacientes convertidos a MHCR resecables (R0), después de un tratamiento adyuvante para MHCR inicialmente irresecables (20, 25, 27, 51, 52, 53, 54). Como resultado de la resección quirúrgica (R0) y los tratamientos actuales para las MHCR, la supervivencia a 5 años oscila entre el 25 y 40 % y a 10 años entre un 12 y 36% (14).

Los recientes avances y mejoría en las técnicas quirúrgicas de resección y el aumento de la eficacia de la quimioterapia cito-reductora, de la quimio- radioterapia, el uso de agentes biológicos anti-angiogénicos y anti crecimiento tumoral y el uso de tratamientos ablativos loco-regionales han conseguido gran mejoría en los resultados (55, 56). Este tratamiento multidisciplinario ha permitido hacer cirugías R0 en el 20 a 35 % de los pacientes con CCR en estadio IV, mejorado las tasas de supervivencia global entre un 35 y 63% a 5 años, dependiendo de la extensión de la enfermedad al inicio del tratamiento y de la respuesta de cada paciente al tratamiento recibido (25, 56).

Al afrontar los casos de MHCR es importante recordar el comportamiento clínico patológico heterogéneo de las MHCR y tener en cuenta los siguientes puntos a la hora de escoger el tratamiento a realizar:

(1) El objetivo principal del tratamiento es lograr la curación o una larga supervivencia libre de enfermedad después de la resección, disminuir la mortalidad post operatoria, disminuir la morbilidad con los tratamientos para las MHCR y lograr suficientes márgenes de resección libre de tumor. (21).

(2) La evaluación de la resecabilidad se debe realizar con estudios de imágenes de alta calidad, de tecnología puesta en escena para radiología diagnóstica e intervencionista en los estudios del hígado tales como resonancia magnética, y tomografía computarizada (TC) abdominal. La



estratificación de la enfermedad extra-hepática con la TC torácica y de pelvis, y en casos seleccionados, la tomografía por emisión de positrones con FDG para la estratificación intra-operatoria (57).

(3) En casos de presencia de Metástasis pulmonar además de las MHCR el paciente debe ser valorado y tratado para la resección total de las metástasis pulmonares (58).

(4) Esquemas de quimioterapia de doble o triple regímenes con combinaciones óptimas para el tratamiento de primera línea, seleccionando este esquema en base a la elección de terapias dirigidas aconsejables para cada caso específico ya sean potencialmente resecables, resecables o no resecables, con beneficios en la supervivencia libre de progresión tumoral (5, 21, 52, 53, 57, 59, 60, 61, 62). El argumento que apoya el uso de la quimioterapia pre-operatoria está basada en la posibilidad que ofrece ésta de disminuir la magnitud de la resección quirúrgica, erradicar micro-metástasis, incrementar las tasas de resección quirúrgica, prevenir la recidiva temprana de las MHCR, y ayudar a seleccionar la quimioterapia específica adecuada en el post operatorio basados en la respuesta terapéutica de la quimioterapia pre-quirúrgica (20). A pesar de sus beneficios, algunos autores han encontrado aumento significativo en la incidencia de complicaciones post-operatorias en pacientes sometidos a quimioterapia pre- resección (R0) sin obtener mejoría en la supervivencia, causado por la presencia de cambios hepáticos tales como esteatosis y lesión vascular debidos a la quimioterapia (20, 53).

La buena respuesta a la quimioterapia pre-quirúrgica está asociada a una supervivencia a 5 años de 37%. La mala respuesta a la quimioterapia pre-resección con poca reducción de tamaño de las MHCR o aumento de tamaño de las MHCR, está asociada a una supervivencia a 5 años de 8% (20, 53).

(5) Es recomendable hacer la correspondiente evaluación de la respuesta tumoral cada 2 meses después de la quimioterapia de primera línea (20, 63, 64, 65).

(6) El uso de los criterios pronósticos de evaluación de respuesta en tumores sólidos a la quimioterapia convencional y de evaluación a los cambios morfológicos basados en el uso de agentes anti-angiogénicos, está claramente correlacionado con el resultado. Aunque las imágenes diagnósticas de alta calidad son fundamentales para el tratamiento de estos pacientes, ninguna técnica de imagen es actualmente capaz de diagnosticar con precisión la respuesta patológica (21, 60).

(7) La duración de la quimioterapia debe ser tan corta como sea posible (teniendo en cuenta la potencial hepatotoxicidad para el hígado remanente) y la resección quirúrgica óptima (R0) debe ser realizada tan pronto como sea técnicamente posible evitando así la progresión tumoral (66).

(8) En los casos de las metástasis sincrónicas (aparición de MHCR en primeros 12 meses después de aparición del tumor primario CCR), aún no está claro el tratamiento y estrategia quirúrgica ideal y su influencia en la incidencia y gravedad de una posible complicación por fallo hepático post resección quirúrgica. Se considera una buena estrategia quirúrgica la resección simultánea del tumor primario de Colon-Recto y las MHCR en casos en los que no necesitan resecciones hepáticas extensas, con resultados a largo plazo similares a las resecciones diferidas. El riesgo de morbilidad y mortalidad aumenta significativamente en los casos que necesiten una resección hepática extensa (20, 67, 68). Por lo tanto, no es aconsejable llevar a cabo la cirugía hepática mayor durante el mismo tiempo quirúrgico del CCR primario. El abordaje quirúrgico a la inversa (primero el hígado) ha producido un resultado tan bueno como el enfoque convencional en algunos casos muy seleccionados (12, 21), pero no debe ser aplicado de manera sistemática.

#### **2.4.1. ESTRATEGIAS QUIRURGICAS**

En la estrategia quirúrgica, es muy importante calcular el volumen del remanente hepático que queda después de la resección del hígado tumoral.

- En casos de hígado al que no se le ha realizado quimioterapia, puede ser suficiente un remanente que constituya un 25% del hígado total (66).
- En casos de hígados sometidos a quimioterapia preoperatoria o casos de esteatosis hepática debe dejarse al menos un 40% de hígado remanente (66).
- En casos de hígados con otra patología de base como fibrosis hepática o pacientes diabéticos debe dejarse un remanente hepático de al menos un 40% (66).
- En pacientes con cirrosis hepática el remanente debe ser de un 60% (66).
- En casos con hipertensión Portal se debe dejar más de un 70% (66).

El fallo hepático es una de las complicaciones más temidas en el post quirúrgico de una resección y es una de las principales causas de mortalidad peri operatoria (69, 70).

En los casos de MHCR en fase avanzada y considerados en el momento del diagnóstico como irresecables porque el potencial remanente es insuficiente, se tiene como opción de tratamiento, el uso de embolización de la vena porta pre-quirúrgico y la hepatectomía tipo ALLPS. De esta manera se consigue un crecimiento en el volumen del hígado sano y la posibilidad de dejar un remanente hepático funcional adecuado (71, 72).

El ALLPS es un procedimiento quirúrgico de dos tiempos:

Durante el primer tiempo se realiza división in situ del hígado con resección de las metástasis en el hígado considerado para remanente hepático y la ligadura de la vena porta de los segmentos hepáticos considerados para resección quirúrgica. El promedio de remanente hepático en relación al peso corporal total (RH/PCT) y el remanente hepático en relación al peso hepático total (RH/PHT) tienen una media de 0,46% y 22,6% respectivamente en el primer tiempo quirúrgico (72, 75, 76).

Existe un período de interface de aproximadamente 10 días en espera de regeneración hepática, en el cual se consigue una ganancia de volumen de remanente hepático. Después del periodo de interface el

promedio del RH/PCT es aproximadamente 0,67%, el promedio del RH/PHT es de 36,3% (72, 74).

Durante el segundo tiempo quirúrgico del ALLPS se finaliza la resección hepática iniciada en el primer tiempo (5, 71, 72, 73, 74).

Los límites prudentes para un adecuado remanente hepático son:

- RH/PCT= Un mínimo de 0,8 y algunos autores sugieren como mínimo prudente 1% en hígado sano y un mínimo de 1,4% en casos de presencia de cirrosis hepática (68, 75, 76).
- RH/PHT= Un mínimo de 20 a 25 % y algunos autores sugieren mínimo prudente de 30% en hígado sano y un mínimo de 51% en casos con presencia de cirrosis hepática (71, 75, 76, 77).

### **Embolización Portal:**

La embolización Portal antes del procedimiento quirúrgico de resección de las MHCR es otra alternativa útil en casos de MHCR en los que se requiere resección amplia y se busca un aumento de volumen de hígado sano para obtener RH adecuado. Después de realizar la embolización portal, en el 70% de los pacientes se procede a la resección hepática, con un riesgo del 10% de insuficiencia hepática post-operatoria. A diferencia de los casos sometidos a resecciones quirúrgicas tipo ALLPS, la progresión tumoral después de la embolización portal fue la razón predominante para no proceder a la resección hepática en estos pacientes (78).

### **CIRUGÍA MINIMAMENTE INVASIVA HEPÁTICA**

La cirugía laparoscópica representa una nueva alternativa para las MHCR. Es un procedimiento seguro y efectivo que podría ofrecer menos morbilidad en casos seleccionados. Los resultados oncológicos son similares a los de la cirugía hepática abierta, pero con menor pérdida de sangre y una recuperación más rápida (79, 80, 81, 82, 83).

### **Técnicas de Ablación:**

Las técnicas de ablación guiadas por imágenes se establecen como tratamientos complementarios sumados a la resección quirúrgica y a la

quimioterapia. Las más utilizadas son la radiofrecuencia y las micro-ondas (84).

#### **2.4.2 QUIMIOTERAPIA (agentes citotóxicos)**

Las MHCR representan un desafío importante para los oncólogos y cirujanos. El tratamiento óptimo requiere un enfoque multidisciplinario para hacer un tratamiento ideal a nivel local y sistémico (11). La quimioterapia como tratamiento complementario de la resección quirúrgica de las MHCR ofrece mejores resultados que la resección quirúrgica como un tratamiento único (13, 20, 53, 85). La quimioterapia es una opción terapéutica en el tiempo pre, intra y post resección quirúrgica de las MHCR.

Los regímenes de quimioterapia utilizados en la actualidad para las MHCR son básicamente FOLFIRI (Leucovorina, Fluoracilo e Irinotecan) y FOLFOX (Leucovorina, Fluoracilo y Oxaliplatino) (22, 53, 86, 87). FOLFOX y FOLFIRI como quimioterapia por sí sola tienen actividad similar y ambos pueden ser asociadas con los productos biológicos, pero tienen un perfil de toxicidad diferente: más alopecia y diarrea más grave para irinotecan y más polineuropatía para oxaliplatino. También tienen interacciones potencialmente diferentes con los agentes biológicos (88).

Para los pacientes con extensas metástasis hepáticas, los esquemas de quimioterapia con FOLFOX y FOLFIRI han mejorado las tasas de resección y la supervivencia (22, 53, 86, 87).

La supervivencia a los 5 años con la quimioterapia como tratamiento único es de menos de 1%, aunque dos estudios recientes con FOLFOX o FOLFIRI, o esquemas combinados, informaron de tasas de supervivencia entre 5% -10% a 5 años con una supervivencia de 12 meses hasta 30 meses (30).

##### **2.4.2.1. QUIMIOTERAPIA PRE OPERATORIA**

En base a los factores oncológicos, la tasa de supervivencia a los 5 años después de la resección de las MHCR oscila desde un 14% en los casos de peor pronóstico, hasta un 60% en los casos de buen pronóstico. Si el paciente tiene más de un factor de mal pronóstico probablemente debería ser referido para la quimioterapia preoperatoria (13).

Durante la última década, se ha obtenido una mejora sustancial en los resultados con el uso de la quimioterapia sistémica en casos de MHCR incluyendo el uso de esquemas de quimioterapia preoperatoria en los pacientes con enfermedad no resecable, con el objetivo de convertirlos en resecables (11, 20, 89, 90, 91). En estos casos, la quimioterapia prequirúrgica tiene un impacto positivo para la supervivencia global y libre de enfermedad, se puede conseguir que entre el 15% al 30% de estos casos se conviertan en resecables (R0) (91).

La toma de decisión de la administración de quimioterapia preoperatoria, debe ser tomada dentro de un contexto multidisciplinario (cirugía, radiología, oncología), individualizando cada caso al evaluar la evidencia en cada situación clínica (29, 30). En pacientes con MHCR potencialmente resecables es recomendable la quimioterapia óptima de doble o triple regímenes de primera línea, combinada con terapia dirigida (21).

Después del tratamiento con quimioterapia en pacientes con MHCR irresecables se han comunicado casos de respuestas radiológicas completas (hallazgos radiológicos con ausencia de lesión metastásica). La desaparición de imágenes de MHCR ocurre en 20% a 30% post-quimioterapia, dejando a un grupo de pacientes con MHCR microscópicas no diagnosticadas. La respuesta completa en la imagen no necesariamente significa una respuesta clínico-patológica completa. La desaparición de la MHCR en las imágenes puede ser el resultado de cambios parenquimatosos asociados a la quimioterapia (esteatosis, esteato hepatitis), que alteran la característica de la imagen y reducen la sensibilidad de los estudios durante la quimioterapia. El 27% de las MHCR que desaparecen son evidenciadas durante la laparotomía y en más del 25% de las lesiones que desaparecen, se encuentran metástasis microscópicas en el estudio anatómico-patológico, y se evidencia lesiones residuales en el 83% de los casos de MHCR desaparecidas post-quimioterapia. Por lo tanto, es recomendable el tratamiento quirúrgico después de una respuesta radiológica completa post-quimioterapia en estos pacientes, siempre que sea técnicamente posible (57, 92). La normalización del CEA en estos pacientes, es un factor predictor independiente de una verdadera respuesta (29, 30).

El objetivo principal de la quimioterapia pre-quirúrgica es disminuir la magnitud de la resección quirúrgica, erradicar micro-metástasis, incrementar el porcentaje de resección quirúrgica y la prevención de la recidiva temprana. En casos tratados con quimioterapia pre-operatoria, ha sido comunicada una supervivencia libre de enfermedad a 3 años de 36,2%; en comparación con la supervivencia libre de enfermedad a 3 años en casos sin quimioterapia pre-operatoria de 28,1% ( $P=0,041$ ) (53). La quimioterapia pre-operatoria ayuda a seleccionar la quimioterapia específica adecuada en el post operatorio, basados en la respuesta terapéutica a la quimioterapia pre-quirúrgica, ayudando así a identificar pacientes con tumores biológicamente agresivos en los cuales la resección hepática puede no ser la mejor indicación. La resección quirúrgica en estos casos podría empobrecer el pronóstico de supervivencia a largo plazo (20).

En los casos de metástasis resecables desde el inicio no está demostrada la utilidad o la obtención de mejores resultados con la terapia neo-adyuvante con quimioterapia pre-operatoria (93). Es importante tener en cuenta que la quimioterapia neo-adyuvante puede inducir a daños en el hígado remanente, dependiendo del número de ciclos realizados (66, 94), y en algunos casos, la quimioterapia preoperatoria puede aumentar las complicaciones postoperatorias (11). Por lo tanto, la quimioterapia preoperatoria se debe reservar para los pacientes cuyas MHCR son marginalmente resecables o no resecables. En estos casos está bien establecido que puede mejorar la resecabilidad y la supervivencia libre de enfermedad (11, 94). Para los pacientes con metástasis marginalmente resecables está demostrado que la quimioterapia pre operatoria es importante tanto para el logro de un estado resecable como para la mejoría del pronóstico en estos pacientes (91).

#### **2.4.2.2. QUIMIOTERAPIA PERI-OPERATORIA**

Se ha demostrado que la quimioterapia peri-operatoria, también podría dar como resultado una mayor supervivencia libre de enfermedad en comparación con la cirugía como único tratamiento (25).

En casos de MHCR resecables la quimioterapia peri-operatoria puede estar asociada con un superior intervalo de tiempo, libre de enfermedad

(21, 66). Se han comunicado casos tratados con quimioterapia por vía portal con 5 fluoracilo (100 mg/día) y heparina (5000 U/día) durante 7 días con resultados favorables para prevenir recidiva de metástasis, consiguiendo sobrevida libre de enfermedad a 5 años de 25% vs 12,5% en casos de cirugía sin quimioterapia peri-operatoria (95). Por lo tanto, la Quimioterapia por vía portal podría ser un tratamiento eficaz en la prevención de la metástasis hepática después de la resección quirúrgica del CCR (95).

#### **2.4.2.3. QUIMIOTERAPIA POST RESECCION DE MHCR**

La quimioterapia post-operatoria es recomendada después de toda resección quirúrgica (R0) tanto en los casos resecables desde su inicio, como en los convertidos en resecables con quimioterapia pre-operatoria (13, 57).

#### **2.4.2.4. QUIMIOTERAPIA Y ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-EGFR Y ANTI-VEGF (Agentes biológicos dirigidos)**

Se han utilizado anticuerpos monoclonales que actúan contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La combinación de citotóxicos y un tratamiento biológico dirigido mejora los resultados y consigue una supervivencia media superior a 24 meses, convirtiéndose en un avance significativo en el tratamiento para las MHCR. Aún se considera que se debe justificar su validación con estudios prospectivos (22, 53, 86, 87, 96, 97, 98).

Los Ac monoclonales anti-EGFR (cetuximab y panitumumab) disminuyen la tumorigénesis (crecimiento tumoral e invasión tumoral), y forman parte de los ac. monoclonales de primera línea para las MHCR (97, 98, 99).

Los anticuerpos monoclonales anti-VEGF disminuyen la neovascularización a nivel tumoral. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal tipo inmunoglobulina humana, dirigido contra el VEGF. Se une al VEGF-A circulante y aumenta la actividad de cualquier régimen citotóxico



activo. El bevacizumab ha demostrado aumentar la supervivencia. Tiene efectos secundarios específicos relacionados con la hipertensión, proteinuria, trombosis arterial, hemorragia mucosa, perforación gastrointestinal y problemas de cicatrización, pero no aumenta los efectos secundarios relacionados con la quimioterapia. (95, 98).

La asociación de quimioterapia con agentes biológicos reduce el tamaño de las metástasis aumentando la posibilidad de una resección adecuada (R0), lo que conlleva a una supervivencia global a dos años de hasta un 96% (100). Se está convirtiendo en un tratamiento médico estándar personalizado para los pacientes con MHCR con buenas respuestas hasta en un 80% de casos. Son regímenes prometedores también en casos de MHCR irresecables y con metástasis extra-hepáticas (38, 91, 101, 102). En un estudio multicéntrico en Alemania y Austria, la tasa de resecabilidad aumentó de 32 % a un 60 % después del uso de quimioterapia prequirúrgica tipo FOLFOX o FOLFIRI asociado con cetuximab (25).

La respuesta terapéutica es variable y se requieren marcadores predictivos de respuesta tales como la mutación de Gen KRAS y expresión del factor (EGFR) y del factor (VEGF). Estudios recientes han demostrado que los pacientes con mutaciones activadas y no activadas en el gen KRAS y los niveles altos del factor de crecimiento epidérmico o de su RNAm están directamente relacionados con una mejor respuesta al tratamiento con Cetuximab, principalmente en la primera línea de tratamiento con quimioterapia (38, 101, 102).

Las mutaciones de KRAS se han establecido como un biomarcador predictivo importante para la resistencia en la quimioterapia para las MHCR. Recientemente se ha demostrado beneficio clínico con tratamientos dirigidos a las respuestas moleculares, en particular con anticuerpos monoclonales del receptor de factor de crecimiento epidérmico (Ac Monoclonales anti-EGFR como el Cetuximab, panitumumab). Sin embargo, menos del 20% de los pacientes con MHCR realmente pueden beneficiarse con este tratamiento de anticuerpos anti-EGFR, muchos pacientes con tumores KRAS no mutados no responden a este tratamiento (26). Ha sido estudiada la relación de CCR con KRAS no mutados y su asociación con la presencia de mutaciones de

BRAF, del PIK3CA en su exón 20 y pérdida de PTEN; y los resultados los postulan como posibles marcadores predictivos de mejores resultados en casos KRAS no mutados en MHCR tratados con anti-EGFR (26, 103).

El bevacizumab no depende del estado del gen KRAS (13, 85). El bevacizumab se une a todas las iso-formas de VEGF-A, bloqueándolo de la unión a sus receptores afines. El bevacizumab es el único agente antiangiogénico aprobado por la FDA para el tratamiento de primera línea para MHCR. Se demostró que con el tratamiento FOLFIRI (irinotecán, fluoro uracilo y leucovorina) más bevacizumab, aumentó la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la tasa de respuesta frente a la quimioterapia sin el agente anti angiogénico (97). Por lo tanto, en tumores sin mutaciones oncogénicas en KRAS puede ser útil el uso de bevacizumab combinado con quimioterapia estándar o la administración concomitante de los tres agentes activos (FOLFOXIRI) en los pacientes adecuados. En los pacientes con mutaciones en el gen KRAS, la combinación de Cetuximab y de FOLFIRI, FOLFOX mejoró las tasas de respuesta y la tasa de resección en los ensayos de fase III-II. Con un menor nivel de evidencia, Panitumumab es una alternativa que ha mostrado buenos resultados combinado con FOLFOX (38, 86, 91, 102, 104).

El Ramucirumab es un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular del receptor-2 del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFR-2) recientemente aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) que mostró un perfil de seguridad manejable para su uso en MHCR en combinación con 5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecán (FOLFIRI) (97).

Dado que los nuevos agentes antiangiogénicos están apareciendo en el CCR, se necesitan más estudios que comparen la eficacia de esos fármacos en la segunda línea para ayudar a guiar a los médicos en la selección de la opción óptima para cada paciente. Sería interesante evaluar el uso de ramucirumab en otros entornos clínicos, como después del tratamiento de primera línea sin bevacizumab o como monoterapia para pacientes que no toleran la quimioterapia (97)

En resumen, el ramucirumab añadido a FOLFIRI mejora la supervivencia global en el tratamiento de segunda línea para el cáncer colorrectal metastásico después de la progresión en 5-fluorouracilo, oxaliplatino y bevacizumab (97).

El regorafenib es un inhibidor multi-quinasa disponible para administración oral, que posee propiedades anti-angiogénicas. Regorafenib ha demostrado su eficacia en pacientes pre-tratados con todas las otras opciones anteriormente descritas en un gran ensayo de fase III, donde se prolongó la supervivencia de estos pacientes en comparación con el placebo. Por lo tanto, el regorafenib debe ser considerado como una opción estándar en los pacientes pre-tratados. Efectos secundarios más relevantes incluyen una reacción específica mano-pie-piel, fatiga y enzimas hepáticas elevadas, limitando el beneficio a los pacientes en buen estado de funcionamiento con función de órganos adecuada (105).

Los regímenes de quimioterapias que debemos utilizar en la actualidad dependen del estado mutacional de KRAS y los perfiles de toxicidad de las drogas en el contexto de cada paciente. Recientes estudios con 4 combinaciones de drogas (citotóxicas y agentes biológicos dirigidos) demostraron tasas de respuesta de hasta el 80%, incluso para la enfermedad avanzada y por lo tanto son regímenes prometedores para tratamiento adicional en los pacientes con metástasis limitadas a hígado o con metástasis pulmonares resecable o no resecable (91).

Es necesario conocer la Histología del tumor primario o de las metástasis y las características genéticas específicas antes de la iniciar el esquema de quimioterapia ideal para cada paciente. La adecuada selección del tratamiento de primera línea es crucial para los resultados en el pronóstico de los pacientes con MHCR. Para conseguir resultados más efectivos se debe tener en cuenta:

- 1) Intensidad óptima de tratamiento.
- 2) Estrategia de mantenimiento más apropiada.
- 3) Medicamentos biológicamente más efectivos en cada caso dependiendo de las características genéticas de las MHCR.

Es necesaria más información molecular y genética acerca del comportamiento biológico del tumor primario y de las MHCR para crear biomarcadores más precisos y estrategias de tratamiento más efectivas para la cura de estos pacientes. Estos puntos podrían tener alto impacto en la elección del tratamiento ideal para cada paciente (27).

En los tumores KRAS mutados, la mediana de supervivencia global ha sido de 23,4 meses con régimen basado en oxaliplatino y 23,6 meses con régimen basado en irinotecán, sin diferencias significativas. En los tumores de tipo KRAS no mutados, la mediana de supervivencia fue de 30,3 meses con régimen basado en oxaliplatino y 25,4 meses con régimen basado en irinotecán, sin diferencias significativas. Del mismo modo, KRAS en estado mutacional no tuvo un efecto significativo sobre la eficacia de oxaliplatino o irinotecan en relación con la supervivencia libre de progresión tumoral (106).

## **2.5. CLASIFICACIONES PRONÓSTICAS y FACTORES PRONÓSTICOS**

Clásicamente, el pronóstico de los pacientes con MHCR se ha estimado a partir de puntuaciones con índices pronósticos clínicos basados en características preoperatorias. Estos índices provienen de series históricas retrospectivas y predicen la recidiva y la supervivencia de los pacientes después de la resección de las MHCR, por lo que son útiles para seleccionar los pacientes que tendrán un mejor resultado tras la resección quirúrgica e indicar otras modalidades de tratamiento en los pacientes de mal pronóstico (15, 16, 107).

### **2.5.1. DICES PRONÓSTICOS:**

Los Criterios Pronósticos Clínicos más utilizados son los Criterios de FONG que están constituidos por 5 factores independientes, predictores de recidiva en los pacientes con MHCR (15, 16).

Estos factores son: Nódulos linfáticos positivos en el tumor primario, Intervalo menor de 12 meses libre de metástasis después del diagnóstico del tumor primario CCR (metástasis sincrónicas), la existencia de más de una MHCR, la presencia de un nódulo metastásico mayor de 5 cm. y niveles de Antígeno Carcino-embriionario (CEA) mayor a 200 ng. / ml. La presencia

de un mayor número de criterios se asocia con un menor porcentaje de supervivencia (15, 28, 29). Ver Tablas 1 y 2.

**TABLA 1** (15)

<b>FACTORES CLINICOS PREDICTORES DE RECIDIVA</b>			
<b>CRITERIOS DE FONG</b>	<b>Haza Rt</b>	<b>Coefficient I</b>	<b>p</b>
Antígeno Carcinoembrionario mayor de 200 ng/ml	1.5	0.4	0.01
Más de 1 tumor metastásico	1.5	0.4	0.0004
Nódulo mayor de 5 cm	1.4	0.3	0.01
Nódulo linfático primario-positivo	1.3	0.28	0.02
Intervalo libre de enfermedad menor de 12 meses	1.3	0.25	0.03
<b>OTROS CRITERIOS</b>			
Tumor bilateral	0.9	20.1	0.4
Enfermedad metastásica extra-hepática	1.7	0.5	0.003
Márgenes positivos	1.7	0.5	0.004

**TABLA 2 PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA RELACIONADO CON SCORE DE CRITERIOS DE FONG** (15)

<b>Score</b>	<b>1 año</b>	<b>2 años</b>	<b>3 años</b>	<b>4 años</b>	<b>5 años</b>	<b>Mediana</b>
<b>0</b>	93	79	72	60	60	74
<b>1</b>	91	76	66	54	44	51
<b>2</b>	89	73	60	51	40	47
<b>3</b>	86	67	42	25	20	33
<b>4</b>	70	45	38	29	25	20
<b>5</b>	71	45	27	14	14	22

Los criterios de mal pronósticos de Nordlinger incluyen: 1.- Pertenecer al género femenino, 2.- Paciente mayor de 60 años, 3.- Afectación de la capa serosa del colon e invasión linfática en el tumor primario, 4.- Tamaño de las metástasis mayores o igual a 5 cm, 5.- Número de metástasis hepáticas mayor o igual a 4, 6.- Tiempo transcurrido menor de dos años entre el tratamiento del CCR y el hallazgo de MHCR y 7.- Bordes de resección libre de tumor MHCR mayor de 1 cm. (16)

Debido al comportamiento heterogéneo en los pacientes con MHCR y a las mejoras en el tratamiento quirúrgico y adyuvante de las MHCR producido durante estos años (31), estos índices pronósticos son considerados actualmente con una sensibilidad y especificidad subóptimas (17,18).

### **2.5.2. EL PAPEL DE LOS MARCADORES TUMORALES EN CASOS DE MHCR.**

Teniendo en cuenta los factores pronósticos clínicos establecidos en este momento, la tasa de supervivencia a los 5 años después de la resección de las MHCR es del 60% en casos con un factor o ninguno de mal pronóstico (FONG 0 o 1), y sólo del 14% en los casos con puntuación de criterios pronósticos muy alta (FONG 5) (92). Sin embargo, en los casos con puntuaciones intermedias estos factores son insuficientes para lograr predecir el pronóstico y supervivencia de estos pacientes.

Una de las estrategias para mejorar la fiabilidad pronóstica en los pacientes con MHCR es el uso de biomarcadores que, de forma independiente o asociados a los índices pronósticos clásicos, predecirían la evolución neoplásica del paciente tras la resección quirúrgica de las MHCR (18, 37). Ya es conocido que las alteraciones en los niveles de proteínas específicas y actividades de los factores de traducción proteica dentro del sistema molecular intra-celular son únicos para los diferentes tipos de cánceres y las diferentes etapas de la enfermedad (108); por lo tanto es importante hacer estudios de los comportamientos bio-moleculares dirigidos a cada patología tumoral específica para poder así determinar patrones que sirvan como bio-marcadores pronósticos y potenciales guías para tratamiento de las lesiones tumorales específicas (109, 110, 111).

En este sentido, los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de nuevas técnicas bioquímicas como la proteómica y la genómica aumentando así la capacidad de detectar nuevos biomarcadores asociadas a la enfermedad neoplásica (37, 109, 110, 111, 112).

### **2.5.3. ESTADO ACTUAL EN EL CAMPO DE LA INVESTIGACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES PRONÓSTICOS**

El término de biomarcador biológico se refiere a cualquier característica, sustancia o estructura que se pueda medir de forma objetiva en el cuerpo o en sus productos y permita detectar una enfermedad o su pronóstico. Existen múltiples funciones de los biomarcadores, de los cuales hay 5 funciones principales (113):

1. Biomarcadores de antecedentes: Identifican el riesgo de desarrollar una enfermedad.
2. Biomarcadores de detección: Para cribado de la enfermedad subclínica.
3. Biomarcadores de diagnóstico: Para detección de la enfermedad cuando ya existen manifestaciones Clínicas.
4. Biomarcadores de estadificación: Para determinación de la gravedad de la enfermedad.
5. Biomarcadores de pronóstico: Para predicción del curso de la enfermedad o de la respuesta a una terapia (113):

Actualmente no hay marcadores predictivos precisos de MHCR. En la actualidad múltiples centros investigan posibles marcadores biológicos relacionados no sólo con los parámetros clínicos, sino también marcadores moleculares que se sabe que están implicados en el proceso del CCR y de las metástasis hepáticas. Hay muchos estudios recientes que hacen referencia a posibles marcadores séricos como factores pronósticos del CCR, pero aún muy pocos han sido realizados específicamente a nivel de las MHCR (114, 115, 116, 117, 118).

En la actualidad se han realizado muchos estudios en el campo de la genética relacionado con el CCR y estudios que investigan las proteínas a través de la proteómica; especialidad que permite analizar la cantidad, estructura, función y regulación de las expresiones proteicas (22).

En las tablas 3<sup>a</sup> y 3b quedan reflejados algunos de los estudios realizados en estos ámbitos.

Tabla 3a Referencias estudios genética en CCR

<b>Ref. Bibliográfica</b>	<b>GEN</b>	<b>Relación</b>
<b>25, 103, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127</b>	Mutaciones en gen kRAS (hasta 7 mutaciones) las principales en axón 12 y 13.	No respuesta a Tto Ac anti-EGFR, mal pronóstico
<b>103, 119, 121, 122, 127, 128</b>	Mutaciones en gen BRAF, BRAFV600E	No respuesta a Tto Ac anti-EGFR, mal pronóstico
<b>119, 122</b>	NRAS	No respuesta a Tto Ac anti-EGFR, mal pronóstico
<b>26, 103, 119, 121, 122</b>	PIK3CA (axón 20)	No respuesta a Tto Ac anti-EGFR, mal pronóstico
<b>103, 121</b>	Inactivación De gen supresor tumoral PTEN	No respuesta a Tto Ac anti-EGFR. Mal pronóstico
<b>129, 130</b>	Supresión de gen RASSF1A (aumenta el P53)	Daño de ADN, Apoptosis, pérdida homeostasis epitelio intestinal, mal pronóstico
<b>129</b>	FHIT	
<b>129</b>	Promotor de metilación GMT	
<b>131</b>	Metilación de genes CDH13 Y FBLN3	Mal pronóstico
<b>132</b>	06-MGMT	Papel protector
<b>132</b>	Metilación de genes P14ARF, RASSF1A APC1A	Mal pronóstico



Tabla 3b Referencias estudios proteómica en CCR

AUTOR	Pub año	Ref	Hallazgos	Relación
<b>Min BS</b>	Oncol Lett.2012	133	VEGF, TIMP-1	Recurrencia Post R0
<b>Wu Wj</b>	J Transl. Med. 2013	134	Osteopontina. MMP-7 v HGF CDC20	Menor Supervivencia global
<b>Shen F.</b>	Oncol Rep. 2013	135	GATA6	Invasión, MHCR y disminución en supervivencia global
<b>Silvestri A.</b>	Clin Exp.Metástasis. 2013	39	Activación red EGFR-PDGKR-cKit	Metástasis
<b>Huang J.</b>	PLoS One. 2012	30	Osteopontina y su RNAm	MHCR
<b>Chu XY</b>	Acta Histochem. 2012	136	Factor de transcripción FOXM1 y su RNAm	Factor de Crecimiento y migración
<b>Chu XY</b>	J Surg Oncol. 2012	137	Survivin, Survivina-Gen	Invasión y Metástasis
<b>Wang D.</b>	J Gastrointest Surg. 2011	138	MTSS1	Pobre pronóstico
<b>Jin-Song Y</b>	Acta Histochem. 2011	139	Bc1-xl	Pobre Pronóstico
<b>Zhang GJ</b>	Oncol Lett. 2013	140	ZEB1	Pobre pronóstico
<b>Xiao X</b>	J Transl Med. 2013	141	MUC20 con MMP-2, MMP-3 y E Cadherina	Invasión, recurrencia y pobre pronóstico
<b>Fang XF</b>	World J Gastroenterol. 2013	142	SAT B1	Proliferación Celular y Metástasis
<b>Martins SF</b>	Cancer Genomics Proteomics. 2013	32	VEGF-A VEGF-C VEGFR-2 y VEGFR-3	Metástasis y pobre pronóstico
<b>Georges R</b>	J Cell Mol Med. 2012	143	Claudin4	Pobre pronóstico
<b>Katayama M</b>	Surg Today. 2006	40	Alfa Enolasa y Triosafosfato Isomerasa	MHCR
<b>Marti J</b>	World J Surg. 2013	131	Niveles SERICOS de Lipocalin Neutrofil Gelatinasa	Mayor tamaño de metástasis, pobre pronóstico
<b>Li D</b>	Ann Surg Oncol 2009	144	Expresión de IMP3 mRNA	Metástasis, recurrencia post colectomía, Pobre pronóstico
<b>Sase</b>	Int J. Cancer 2012	145	RUNX2	Proliferación celular, migración, potencial invasión tumoral.
<b>Murakami T</b>	Nt J Cancer. 2013	146	Quimiocinas (CXCR3 y CXCR4) y sus receptores	MHCR y linfáticas
<b>Ding YL</b>	Asian Pac J Cancer Prev.2012	147	Supresión de SMO	Aparición de MHCR
<b>Li D</b>	Ann Surg Oncol. 2011	148	Expresión aberrante de MSI-1	Aparición de MHCR
<b>Shen YM</b>	Oncol Rep. 2012	149	Expresión de hBiot2	Mal pronóstico
<b>Wu WJ</b>	Eur J Clin Invest. 2013	150	Baja regulación de BRD7 en cel tumorales de CCR	Mal pronóstico
<b>Tang J</b>	Med Oncol. 2013	151	Baja expresión de BRCA1	Mal pronóstico
<b>Pentheroudakis G</b>	BMC Cáncer. 2013	127	AREG mRNA (KRAS no mutados) EREG mRNA en vías de señalización de EGFR (KRAS independiente)	Mala respuesta a TTo con Ac monoclonales anti EGFR. Mal pronóstico.

**PERSPECTIVAS FUTURAS (PROTEOMICA  
GENOMICA Y BIOMARCADORES)**

---

---

### **3. PERSPECTIVAS FUTURAS (PROTEOMICA GENOMICA Y BIOMARCADORES)**

#### **3.1 PROTEOMICA**

La proteómica se define como el estudio del proteoma (conjunto de proteínas expresadas en una célula particular bajo condiciones de medio ambiente y etapa de desarrollo específicas) (22, 150, 151).

Para el estudio proteómico efectivo es fundamental tener en cuenta la elección de la fuente de biomarcadores. La fuente más utilizada es sin duda, el plasma o el suero y otra fuente podría ser orina, saliva, líquido cefalorraquídeo o biopsias de tejidos. El suero o plasma son fuentes de elección porque son fácilmente disponibles y contienen especies de gran tamaño de proteínas y metabolitos, sin embargo, las proteínas de relevancia clínica en plasma son difíciles de determinar. La sangre, es una excelente fuente de biomarcadores candidatos, ya que recoge las proteínas liberadas de tumor y puede ser fácilmente obtenido por un procedimiento no invasivo. El estudio de proteómica en tejidos tumorales es una guía inicial importante ya que orienta con el hallazgo de proteínas específicas que participan de alguna manera en el determinado tejido tumoral estudiado (152, 153).

El metaboloma es el conjunto completo y dinámico de las pequeñas moléculas y elementos químicos denominadas metabolitos (intermediarios metabólicos, hormonas y metabolitos secundarios) que se pueden encontrar en un organismo vivo, sean sintetizados «de novo» o incorporados desde el exterior. El término surgió en analogía con transcriptómica y proteómica. El metaboloma es algo totalmente cambiante, que refleja el estado metabólico de un sistema vivo. Puede influirse por factores internos (estado hormonal) y externos. En 2007, científicos de las Universidades de Alberta y Calgary concluyeron el borrador del metaboloma humano, catalogando y caracterizando 2.500 metabolitos, 1.200 fármacos y principios activos, y otros 3.500 componentes que pueden encontrarse en el organismo. El análisis del metaboloma humano permite describir el estado del organismo haciendo posible el estudio de respuestas celulares, mecanismos de defensa y mecanismos de homeostasis. La mejora de las técnicas de medición de los distintos metabolitos permitirá utilizar en un futuro próximo la

metabolómica como herramienta diagnóstica y ayuda al tratamiento médico. Existen nuevas técnicas de identificación de perfil metabolómico diferencial mediante resonancia magnética nuclear (RNM 600 Mhz) por sondas QXI (154).

El estudio del proteoma humano ha dado lugar a la aparición de literatura científica abundante y creciente que invita a utilizar técnicas proteómicas en el tratamiento de algunas enfermedades y sugiere su futuro uso en laboratorios clínicos y poder ser utilizados en un futuro próximo en la práctica clínica. Sin embargo, en general, no se han encontrado usos estandarizados de técnicas proteómicas en la práctica clínica actual. En lo que respecta a posibles aplicaciones en el corto-medio plazo, muchos expertos tienen opiniones diferentes a los que mencionan las técnicas específicas y piensan que es poco probable su uso en un futuro próximo para la práctica clínica (155).

Estudios han demostrado que alteraciones en cadenas de proteínas específicas ocasionan alteraciones funcionales intracelulares que activan y/o facilitan procesos neoplásicos en todo tipo de cáncer (156, 157). Existen estudios que muestran que las proteínas plasmáticas pueden ser alteradas años antes de la detección del cáncer colorectal como es el caso de la proteína clusterina. Alta concentración de clusterina sérica circulante en muestras pre-diagnóstico sugiere ser un potencial biomarcador que puede mejorar la identificación de personas en riesgo de CCR y podría ayudar en el diseño de las intervenciones preventivas (157).

El Screening para detectar la enfermedad en una etapa temprana hace parte de los principios fundamentales para hacer frente eficazmente a este problema. El uso de biomarcadores es la herramienta prometedora para la consecución de un eficaz enfoque en el tratamiento de enfermedades como los cánceres. Un biomarcador hipotético debe ser una proteína o un metabolito con suficiente especificidad y sensibilidad para discriminar entre las condiciones normales y patológicas. La identificación de proteínas biomarcadoras que reflejan la biología del tumor es una potencial herramienta para hacer frente a una amplia gama de necesidades clínicas en la evaluación de pronóstico y predicción de respuesta a la terapia con

medicamentos (152, 153). El cribado de biomarcadores de diagnóstico para la detección temprana incluye; biomarcadores pronósticos para la estimación de la evolución de la enfermedad, biomarcadores predictivos para la estratificación de tratamiento adyuvante, y biomarcadores de vigilancia para el control de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Una fuente importante para el descubrimiento de biomarcadores potenciales proviene de la investigación proteómica en suero, tejidos tumorales, líneas celulares, tejidos murinos, células madres, materiales clínicos como tejidos y muestras de heces teniendo en cuenta que los Secretomas de tejido tumoral son una fuente rica de proteínas con potenciales biomarcadores en el CCR. En la actualidad existen muchos estudios que identifican potenciales biomarcadores en CCR, pero aún existen muy pocos estudios en MHCR (152, 153, 158, 159, 160).

La proteómica es un campo reciente de la investigación en biología molecular que puede ayudar en la lucha contra el cáncer a través de la búsqueda de los potenciales biomarcadores. Aunque esta técnica es la más extendida para el descubrimiento de nuevos biomarcadores de cáncer, todavía tiene una pobre sensibilidad y reproducibilidad insuficiente, esencialmente debido a la heterogeneidad tumoral. Actualmente en el campo de la proteómica se están desarrollando instrumentación de alta resolución para la vigilancia de alto rendimiento de cambios en las proteínas que se producen en el cáncer (152, 153).

Se han desarrollado pocos biomarcadores que demuestran utilidad clínica para la detección y pronóstico del cáncer. El cáncer se diagnostica hoy, en gran parte, mediante el examen de las células bajo el microscopio y la determinación de la forma y la textura del núcleo. Las bases moleculares característica del cáncer son los componentes de la matriz nuclear (subconjunto de proteínas). Utilizando la proteómica se han identificado biomarcadores específicos para los tipos de cáncer, incluyendo el de próstata, colon y cáncer de vejiga. Algunos biomarcadores de cáncer sirven ahora como la base de ensayos que pueden identificar específicamente los individuos con cáncer mediante el muestreo de la sangre y / u orina (161).

### 3.1.1. PROTEINA

Las proteínas son moléculas biológicas complejas esenciales para el funcionamiento celular y para la vida, son las moléculas biológicas más abundantes en el organismo, formadas por aminoácidos ordenadas en largas hileras o cadenas poli peptídicas mantenidas por enlaces químicos entre grupos amino (NH<sub>2</sub>) de un aminoácido y el grupo carboxilo (COOH) del siguiente aminoácido y este enlace se denomina enlace peptídico. Los aminoácidos existentes son 20 y sus múltiples posibilidades de ordenamiento producen millones de péptidos diferentes (162).

La heterogeneidad estructural de las proteínas les permite su participación en diferentes procesos celulares:

- 1) Como enzimas catalizadores con diferentes reacciones químicas fundamentales para el metabolismo celular.
- 2) Proteínas del cito-esqueleto, mantienen la estructura y la forma de las células.
- 3) Proteína para la comunicación intra- celular (Vía transducción de señales)
- 4) Proteínas de respuesta Inmune.
- 5) Proteínas del mantenimiento de Homeostasis Celular.
- 6) Proteínas que intervienen en el Ciclo Celular (Controlan la replicación de moléculas de ADN) conservando así la información original de una generación a otra.

Todas las proteínas son expresadas por un genoma en las células de cada tejido. Las proteínas son fabricadas en la célula a partir de la información genética codificada en el ADN (dependiendo de la secuencia de nucleótido de cada ADN que la codifica) lo cual origina una secuencia de aminoácidos específica de cada proteína (Síntesis de proteínas).

Síntesis de Proteínas:

- a) ADN en Núcleo celular origina la transcripción a través de la **enzima RNA polimerasa (trasmisión de la información genética)** la cual se transloca en su paso por la membrana nuclear hasta el citoplasma.

Es el origen de la vía de transducción de señales para la síntesis de proteínas específicas.

- b) **RNA de transferencia (molécula transportadora de aminoácidos) interpreta la información** (leídas mediante un código genético universal en tripletas y codones) traída por el RNA polimerasa que viene del núcleo celular. Los codones son en total 64 y codifican los 20 aminoácidos y hay aminoácidos codificados por más de un codón. Alteraciones químicas pueden modificar estos resultados de lecturas produciendo los llamados **modificaciones post-trasduccionales de proteínas**.
- c) **Ribosomas reciben esta información traída por RNA de transferencia.** En los ribosomas se forman las cadenas poli pépticas que originan las proteínas. (Ver Figura 1 y 2)

Las Modificaciones post-trasduccionales de las proteínas pueden ser originadas en el núcleo, citoplasma, retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Estas son utilizadas en las células como mecanismos de control (señalan la localización de las proteínas y pueden alterar su función).

La masa o peso de las proteínas están medidas en Unidad de masa Atómica Dalton y depende de la cantidad de aminoácidos que la compone.

Las alteraciones en los niveles de proteínas específicas y actividades de los factores de traducción proteica dentro del sistema molecular intracelular son únicos para los diferentes tipos de cánceres y las diferentes etapas de la enfermedad (108, 163)

Las alteraciones translacional de las proteínas en el cáncer incluyen:

1. Adaptación del tumor en sí mismo.
  2. El Micro-ambiente del tumor.
  3. Componente integral paciente/enfermedad.
  4. Procesos de adaptación con sobre-expresiones proteicas.
  5. Incremento de actividades específicas de factores de translación.
- (Alteraciones dadas por la pérdida física o funcional de componentes reguladores, incremento de la producción de ribosomas, traslaciones selectivas de RNAm, alteraciones de señales de las vías de traducción de

proteínas durante el proceso) permitiendo así la activación de procesos de traducción irregulares y sin restricciones de síntesis de proteínas determinadas (que influyen en el comportamiento del tumor).

Estos procesos de Traducción proteica ocurren en la progresión del cáncer y tienen características microbiológicas específicas del desarrollo tumoral del CCR y posteriormente de las MHCR (108, 162).

En la actualidad hay un interés clínico en la comprensión de los procesos de traducción proteica y la microbiología que interviene en el desarrollo de la fisiopatología de lesiones tumorales con el fin poder desarrollar también terapias específicas contra el cáncer. Tener el control de la traducción proteica constituye una nueva e importante área en el desarrollo de fármacos para el cáncer humano y encontrar también factores que sirvan como marcadores que guíen a un tratamiento ideal de los pacientes con cáncer (108, 162).

Figura 1



Figura 1. El vínculo entre el ADN y las enzimas (que son, en su gran mayoría, proteínas) es el **RNA**. El ADN de un gen, se **transcribe** para producir una molécula de RNA que es complementaria con el ADN. La secuencia de RNA es entonces **traducida** a la secuencia correspondiente de aminoácidos para formar una proteína. El ADN se transcribe a RNA, y la secuencia de RNA se traduce a la secuencia de aminoácidos correspondiente, formando una proteína.

Publicado 11th March 2014 por Christian Neyoy Siari

<http://apuntesbiologiamol.blogspot.com.es/2014/03/acido-ribonucleico-arn.html>



FIGURA 2

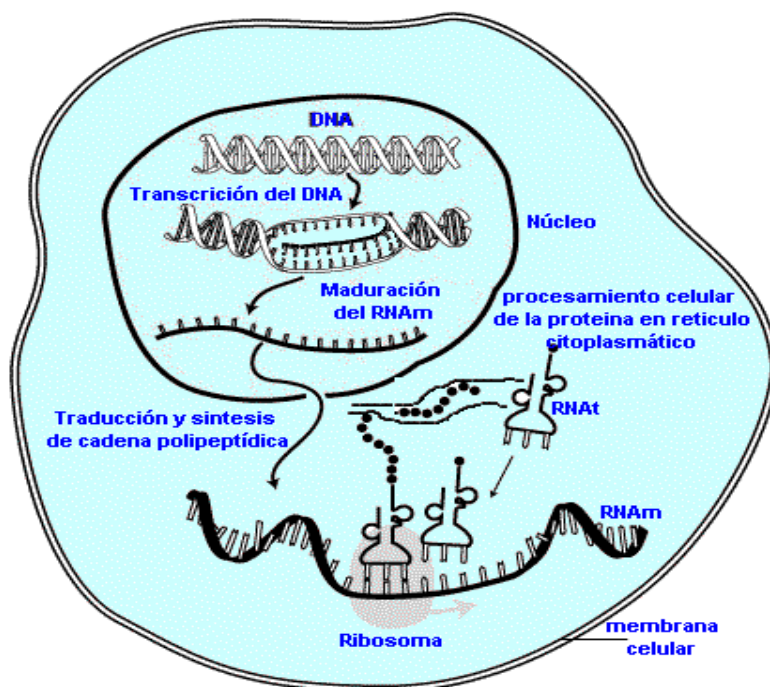


Figura 2. RNA es transcrito en el núcleo celular; una vez completado el proceso de transcripción, este es transportado al citoplasma y traducido por los ribosomas.

Publicado en 29 abril 2009 por Mónica Villalobos, <http://bioclass.over-blog.es/article-30805423.html>

### 3.1.2. PROTEOMA

Es el conjunto de proteínas presentes en determinado tejido. El proteoma puede ser característico para cada tipo de células específicas. Existe un proteoma específico de los hepatocitos. El proteoma en cada tejido puede representar un estado fisiológico particular ya sea normal o patológico (con cambios dinámicos). Es un elemento altamente dinámico y sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimento celular que se estudia. El proteoma de un tejido puede cambiar debido a alteraciones en su ambiente originado por estrés, por acción de fármacos, por requerimiento energético, o por estado fisiológico normal o patológico (interacción proteica por regulaciones de expresión de las mismas) (162).

La proteómica nos permite analizar la cantidad, estructura, función y regulación de la expresión proteica a través de dichos perfiles (22).

Existen dos tipos básicos de análisis proteómico: análisis de proteínas intactas obtenidas de mezclas complejas y análisis de péptidos procedentes de procesos proteolíticos (163). Ambos métodos incluyen el

uso de diferentes técnicas de separación de proteínas, ya sea por electroforesis unidimensional (1DE) o bidimensional (2DE) o por cromatografía. El estudio proteómico se puede clasificar en:

- A) **Proteómica de Expresión:** Descripción del proteoma y medición cuantitativa de los niveles de expresión proteómica.
  
- B) **Proteómica Funcional:** Estudio de función de proteínas dentro del sistema biológico.
  - 1) Cambios de expresión con una función determinada.
  - 2) Regulaciones de la expresión dadas por interacciones proteicas con:
    - a) Modificaciones Post-trasduccionales
    - b) ADN
    - c) RNA
    - d) Proteínas

Pueden existir más de 300 diferentes tipos de modificaciones post-trasduccionales que afectan: la estructura, localización, función y recambio de las proteínas. A su vez estos resultados de las modificaciones post-trasduccionales pueden ser regulados por factores externos, ambos originan procesos de expresión genética diferencial de proteína a pesar de que cada célula tiene la misma información genética en un mismo individuo. Los resultados de estas variaciones en el proteoma se traducen en la diferenciación celular y originan determinadas patologías.

Las interacciones y funciones de las proteínas dentro de una célula juegan un papel muy importante en muchos aspectos del desarrollo y progresión de patologías. En casos de neoplasias juegan un papel importante en muchos aspectos del desarrollo y progresión del tumor, incluso en la invasión tumoral y las metástasis, regulación del ciclo celular, factores de crecimiento y apoptosis asociada a las proteínas (164, 165, 166).

En los últimos años la proteómica ha jugado un papel clave en la identificación de biomarcadores tumorales asociados a una determinada

patología y en el entendimiento de la fisiopatología desde el origen de la enfermedad (22, 23, 167, 168, 169, 170).

En el momento actual los biomarcadores específicos de cáncer empiezan a jugar un papel importante en la detección neoplásica, predicción y la resistencia a la terapia (171, 172). Sin embargo, hasta el momento no existen marcadores moleculares con la suficiente sensibilidad y especificidad para detectar MHCR, predecir su respuesta a tratamientos determinados actuales (173) y que puedan explicar componentes fisiopatológicos que contribuyan a la producción de recidivas y además expliquen las posibles causas que hacen parte activa de la heterogeneidad en el comportamiento clínico de las MHCR.

Se han realizado muchos estudios para identificar las proteínas sobre-expresadas en cáncer CCR (174, 175, 176) y los grupos de proteínas relacionadas con el pronóstico. Sin embargo, no se ha estudiado la sobre-expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo de metástasis hepáticas, la progresión tumoral y el pronóstico de las mismas (177).

### **3.1.3. SELECCIÓN DE TÉCNICA PARA ESTUDIO PROTEOMICO.**

En el momento de seleccionar una técnica estratégica para el estudio es necesario tener en cuenta a) la complejidad del estudio, b) Método de separación ideal, c) Concentración y d) Estabilidad adecuada de las proteínas. Las características básicas de las herramientas proteómicas que han demostrado ser útiles en la investigación del cáncer (153, 166).

#### **3.1.3.1. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE PROTEINAS**

##### **3.1.3.1.1 Técnicas por Electroforesis**

- 1) BIDIMENSIONAL: Técnica de 2 dimensiones que separa hasta 2000 proteínas. En su primera dimensión separa proteínas intactas utilizando métodos de enfoque isoeléctrico capilar y electroforesis zonal capilar, mientras que la segunda dimensión utiliza el peso molecular.
- 2) UNIDIMENSIONAL sólo separa hasta 100 proteínas.

### 3.1.3.1.2. Técnica por Cromatografía

La cromatografía es uno de los métodos más potentes de separación de proteínas que se basa en emplear ciertas características físicas de estas (masa, carga isoelectrónica, bio-especificidad, afinidad líquida) e incluye:

- 1) Cromatografía por afinidad (el más selectivo) que usa anticuerpos, dianas o sustancias químicas que atraen proteínas específicas (22, 177).
  - a) Métodos de cromatografía líquida acoplados a espectrometría de masa (LC-MS) "Liquid Chromatography-mass Spectrometry" Este método separa péptidos de proteínas enzimáticas, proteínas sintéticas y péptidos nativos para ser analizados por SM.
    - Fase reversa micro-capilar
    - Sistema de ionización Electrospray-SM
  - b) Cromatografía Multidimensional de flujo continuo "Multidimensional protein isolation technology" (MudPit) de alta resolución, de afinidad, de intercambio iónico y de exclusión molecular por marcaje con isótopos estables).
- 2) Líquida de alta resolución (o de fase inversa).
- 3) De intercambio Iónico.
- 4) De exclusión molecular por tamaño.

### 3.1.3.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

- 1) Reducción de puentes di sulfuro
- 2) Alquilación de Cisteína
- 3) Exposición de sitios específicos de corte enzimático
- 4) Evita la formación de dímeros.

### 3.1.3.3. METODOS DE ANALISIS DE PROTEINAS

La separación de proteínas se sigue de diferentes modalidades de análisis por espectrometría de masas (MS). Esto proporciona resultados de análisis con sensibilidad, exactitud y rapidez.

Los MS tienen como función

- a) Identificar las proteínas,

- b) Conocimiento de estructura primaria de la proteína (secuencia de Aminoácidos),
- c) identificación de modificaciones post-traduccionales,
- d) cuantificación de la expresión proteica (Proteómica cuantitativa).

Es un proceso que se compone de 3 elementos fundamentales:

- 1) **Sistema de Ionización:** Son sistemas que generan macromoléculas peptídicas ionizadas que pueden estar disueltas en fases líquidas (realizándose la Ionización por Electrospray: ESI) o disuelta en matrices sólidas en las que la ionización se realiza por bombardeo de rayos láser (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization: MALDI o Surface Enhanced Laser Desorption Ionization: SELDI). Pasándolos a fase gaseosa que atraviesa campo magnético al vacío dependiendo de su carga eléctrica y con una velocidad dada de acuerdo a su masa (peso en Dalton) (163).

**ESI:** Muestras disueltas en fase líquida.

**MALDI Y SELDI:** Muestras disueltas en matrices sólidas.

Ambas generan Iones.

- 2) **Detector de Iones** Los péptidos ionizados por láser o electrospray se aceleran por un tubo de vuelo a través de un campo eléctrico desde la muestra a estudiar hacia el detector de iones al final del tubo. El detector recibe los iones a medida que alcanzan el extremo del tubo.
- 3) **Analizador de masa:** Realiza la cuantificación y la identificación final de las proteínas en base al tiempo de vuelo (For Time Of Flight: TOF) de cada péptido o proteína ya que la velocidad de vuelo depende de su peso molecular (177).

Las mejoras en técnicas proteómicas de espectrometría de masas (MS), junto con técnicas de separación y purificación han conducido a una mayor precisión, sensibilidad y las mejoras en la identificación, cuantificación y caracterización de alteraciones de procesos post-traduccionales intracelulares (112).

### 3.1.3.3.1. ANALIZADORES DE MASA

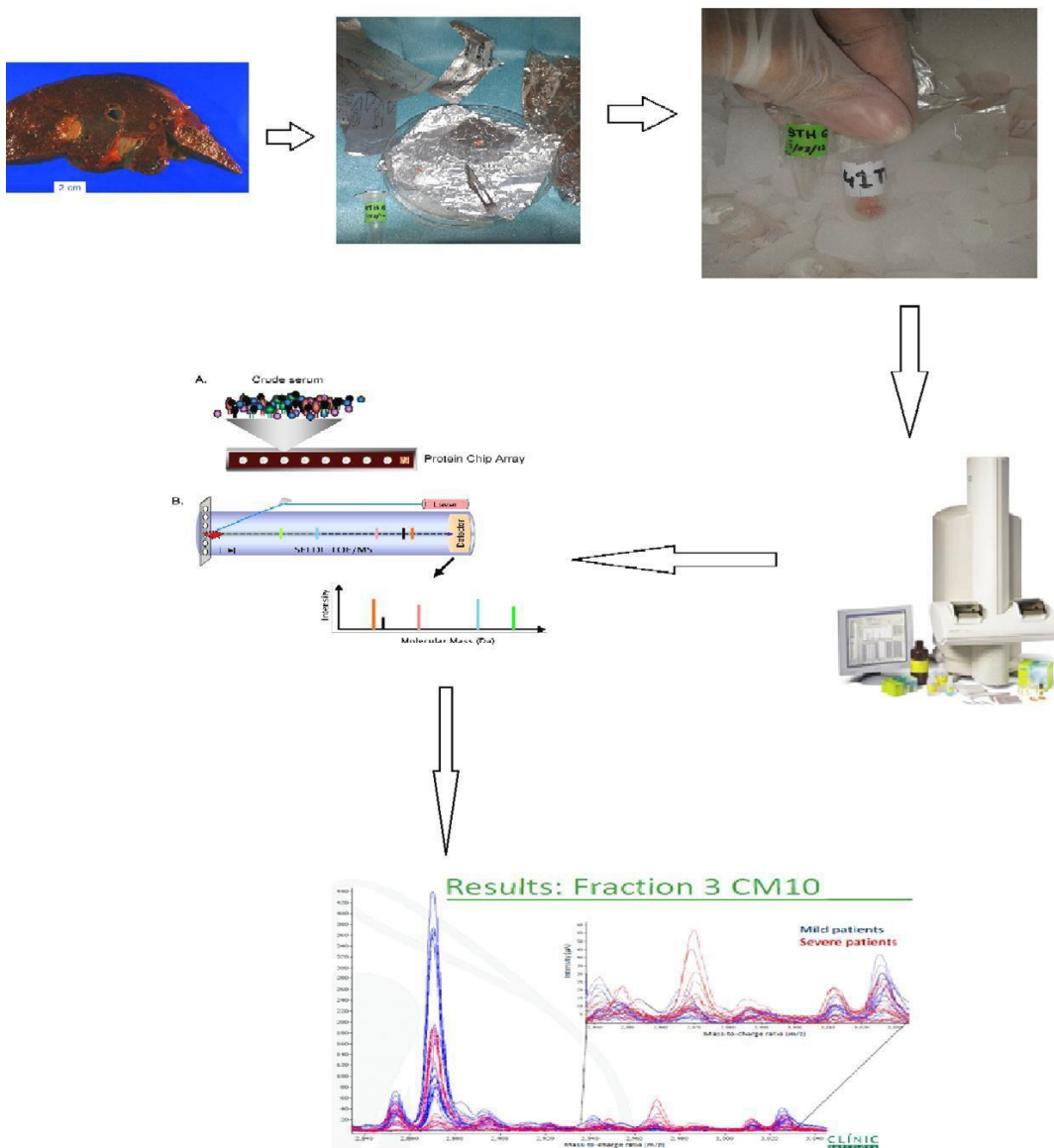
Los Analizadores de masa se basan en control de campos electromagnéticos aplicados según la técnica: 1) Separación de Iones, 2) Resolución de cargas Isotópicas, 3) Fragmentación y 4) Capacidad de operación en polaridades diferentes.

Técnicas proteómicas con métodos de separación por Cromatografía con uso de membranas cromatográficas de superficies mejoradas con características específicas dirigidas que permiten una separación proteica más precisa para observar determinados perfiles proteómicos. El uso de estas membranas cromatográficas modificadas, el sistema de ionización por Láser asociado al **analizador de masa** (de separación de iones) **TOF (tiempo de vuelo)**, son los componentes fundamentales de las Técnicas para estudios proteómicos (MALDI-TOF/MS y SELDI-TOF/MS) que acopladas a la espectrometría de masas (MS) son las dos técnicas más ampliamente utilizadas para el descubrimiento de biomarcadores en casos de cáncer en la actualidad (178).

**3.1.3.3.2. DETECTORES:** Detectan el flujo liberado a través del analizador, amplifican y transmiten la señal al computador para reflejarla como Picos en base a su peso molecular en Dalton y su concentración.

**3.1.3.4. ANALISIS DE DATOS:** Interpretación del MS dado por Software asociado al SELDI\_TOF/MS. (Ver Figura 3)

Figura 3.



#### PROCEDIMIENTOS PARA ESTUDIO DE MUESTRAS CON SELDI TOF/MS

- 1- Hígado con MHCR.
- 2- Corte y peso de tejido congelado para estudio (MHCR)
- 3- Procesamiento de muestras a estudiar.
- 4- SELDI TOF/MS.
- 5- Sistema de ionización. Detector de iones. Analizador de masas. Detectores del flujo liberado a través del analizador.
- 6- Análisis de datos proporcionados por software asociado al SELDI TOF/MS.

La mayoría de estas imágenes fueron obtenidas durante nuestro proceso de investigación.

Las imágenes 5 y 6 de esta figura son autoría de Domenico Girelli y Natascia Campostrini. Policlinico G.B. Rossi - Laboratorio LURM, ala ovest, piano terra, laboratorio 3 - stanza 73. Piazzale L.A. Scuro, 10. 37134 Verona (Italy). Telefono: 045 812 8421 (lab) • 045 812 4791.

### 3.2. TÉCNICA SELDI –TOF/MS

La técnica SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) es una variación de la técnica MALDI que utiliza una diana cromatográfica de retención modificada para que tenga afinidad bioquímica con las proteínas de la muestra, siendo una técnica de elección para el análisis proteómico de mezclas complejas de proteínas debido a su alto rendimiento y su fiabilidad para determinar perfiles proteómicos y descubrir nuevos biomarcadores potenciales (109, 179, 180). Para el estudio proteómico de un tejido con la Técnica SELDI-TOF/MS se necesita una pequeña cantidad de muestra del tejido a estudiar, la cual hace que sea una técnica adecuada para el análisis de biopsias (181, 182, 183). Los picos de proteínas detectadas por SELDI-TOF/MS no pueden ser identificados con la técnica de MALDI (173, 180, 184, 185).

Varios estudios han utilizado SELDI-TOF/MS para la identificación de biomarcadores potenciales en diversos fluidos biológicos y en 2009 la FDA (the Food and Drug Administration) aprobó el uso de múltiples biomarcadores diagnóstico (OVA1) resultados de investigaciones con el uso del proteómica con SELDI-TOF/MS (173, 185).

Todas las características mencionadas anteriormente hacen de SELDI-TOF/MS una excelente técnica de elección para la identificación de potenciales biomarcadores en el tejido hepático.

La Técnica SELDI-TOF/MS está basada en tres elementos fundamentales:

- 1) Protein-Chips Arrays (Membranas cromatograficas con matrices modificadas.
- 2) Lector de Protein-chips
- 3) Software asociado.

En esta técnica, la matriz que contiene macromoléculas peptídicas se adhiere a una superficie (array) modificada específicamente para la unión a péptidos o proteínas afines de acuerdo con sus propiedades bioquímicas. Los arrays son matrices de superficies cromatográficas o biológicas que contienen sustancias específicas capaces de atraer determinados grupos de proteínas por afinidad bioquímica, existiendo diferentes tipos (hidrofóbicos,



hidrofílicos, de intercambio iónico, de metal inmovilizado, de tipo químico) según la necesidad de obtener determinados perfiles proteicos a partir de mezclas biológicas. Los arrays pueden estar químicamente activos para atracción iónica (catión/anión) o pueden contener moléculas captadoras de ADN, anticuerpos u otras proteínas con capacidad para unirse específicamente a la proteína a detectar, lo que permite el análisis de interacciones proteína-proteína, proteína-ADN o proteína-mARN.

Algunas superficies o arrays cromatográficos usualmente utilizadas son (166, 177):

- CM10: el intercambio es de tipo iónico-catiónico e intensidad débil-positiva. Se compone de varios grupos carboxílicos que proporcionan una superficie aniónica que producen interacción electrostática con arginina, lisina y residuos de histidina.
- IMAC30: su superficie de unión es un metal inmovilizado que incorpora ácido nitrilo acético. Forma un complejo octaédrico estable con iones metálicos polivalentes (por ejemplo,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Ga}^{+3}$ ). Una vez cargado con el ión metálico seleccionado quedan dos sitios libres en el complejo octaédrico que pueden interactuar con aminoácidos específicos como histina, cistina y tripsina.
- Q10: el intercambio es de tipo iónico-aniónico fuerte y se compone de grupos de amonio cuaternario que poseen superficie catiónica.
- NP20: de tipo hidrofóbico, usado en cromatografía de fase normal.
- H4: usado en cromatografía de fase inversa.

Una vez realizado el proceso de unión de las moléculas a los arrays, se procede a su lavado y a la liberación de las proteínas que se unen entonces de forma inespecífica a la matriz a ionizar. Para eso se aplica un tratamiento con moléculas absorbentes de energía y ácido cinapínico que cristaliza la matriz y hace posible el desprendimiento (desorción) de las proteínas de la membrana y su posterior ionización con láser. Estas

matrices cristalizadas son introducidas en el sistema de ionización SELDI y desde los cristales de la muestra y la mezcla de la matriz las proteínas/péptidos se ionizan y aceleran a través del tubo de vuelo hacia el detector, donde se analiza el tiempo de vuelo dependiente del peso molecular de los iones (TOF/MS) y se realiza la medición de la masa y la carga de cada ion a partir de la longitud del tubo, la energía cinética dada a los iones por el campo eléctrico y el tiempo necesario para recorrer la longitud del tubo (18, 186). De esta manera las proteínas se separan según sus diferencias de relación masa/carga ( $m/z$ ) y se genera el perfil proteómico que muestra diferentes picos representativos de la cantidad de sustancias ordenadas por su masa/carga (22, 109).

La oncoproteómica se basa en la aplicación de la tecnología proteómica al campo de la oncología, lo cual puede permitir el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores útiles para el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de enfermedades tumorales (22, 23, 183). La técnica SELDI es una de las técnicas proteómicas que mejor se ha adaptado al desarrollo y descubrimiento de nuevos biomarcadores que sirvan en estados fisiológicos normales o de enfermedad (23, 183). La obtención de los perfiles proteómicos con la técnica SELDI es relativamente rápida y los estudios que se han realizado con ella muestran que es una técnica fiable (179). La técnica SELDI ha demostrado ser particularmente útil para detectar perfiles y picos de expresión proteica que pueden ser potenciales biomarcadores de enfermedad y en un futuro próximo permitirá realizar ensayos clínicos de múltiples biomarcadores con alto grado de sensibilidad y especificidad (109, 179).

Aunque los diferentes estudios hasta la actualidad han conseguido encontrar proteínas que se pueden utilizar para discriminar diferentes entidades tumorales (174, 183), poco se sabe acerca de los pacientes con MHCR (186). En este sentido, el análisis de perfiles proteómicos en pacientes con MHCR permitiría identificar perfiles proteómicos asociados a patrones de comportamiento clínico como el buen o mal pronóstico tras la resección de dichas MHCR y posteriormente la identificación de biomarcadores.



## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

---

---

## 4.1. HIPOTESIS DE TRABAJO

Las interacciones y funciones de las proteínas dentro de una célula juegan un papel muy importante en muchos aspectos del desarrollo y progresión del tumor como la invasión tumoral, la aparición de metástasis, la regulación del ciclo celular, los factores de crecimiento y la apoptosis (164, 187). Existen estudios que demuestran que las diferencias en la expresión de ciertos marcadores moleculares del CCR pueden representar diferentes evoluciones clínicas (164). Se han realizado muchos estudios para identificar las proteínas sobre-expresadas en CCR y los grupos de proteínas relacionadas con el pronóstico (165, 175). Sin embargo, no se ha estudiado la expresión de proteínas relacionadas con la progresión tumoral y el pronóstico tras la resección de las MHCR, por lo que nos planteamos la siguiente hipótesis:

Existe un perfil proteómico específico en el tejido hepático tumoral de los pacientes con MHCR. Este perfil proteómico es capaz de predecir el comportamiento clínico de estos pacientes, y por lo tanto orientar hacia el mejor tratamiento en cada uno de ellos.

## 4.2. OBJETIVOS

Para verificar esta hipótesis nos hemos propuesto como **objetivo principal** la determinación de perfiles proteómicos en el hígado de tres grupos de pacientes:

1. Grupo de pacientes con MHCR con comportamiento clínico agresivo (criterios de FONG 4 a 5).
2. Grupo de pacientes con MHCR con comportamiento clínico menos agresivo (criterios de FONG 0 a 1).
3. Grupo de pacientes sanos (ausencia de CCR y MHCR).

Una vez conseguido el objetivo principal, nuestro estudio propone como **objetivos secundarios**:

- 1.a- Establecer una comparación entre los perfiles proteómicos de casos sanos y casos de enfermos con MHCR. 1.b- Identificar diferencias entre los

perfiles proteómicos en los tres grupos que puedan ser utilizados como marcadores moleculares que pronostiquen precozmente el comportamiento clínico después de la resección quirúrgica de las MHCR.

2.- Encontrar una correlación entre la expresión de un panel de proteínas y la agresividad del tumor de acuerdo con los criterios pronóstico de Fong.

3.- Desarrollar marcadores predictivos / pronóstico de metástasis hepáticas para la recidiva después de la resección hepática; no sólo guiados por los parámetros clínicos, sino también por marcadores moleculares implicados en el proceso de la metástasis hepática.

4.- Plantear potenciales medidas terapéuticas adyuvantes específicas en base a la presencia de ciertas características en los determinados perfiles proteómicos.



## **PACIENTES, MATERIALES Y METODOS**

---

---



## **5. PACIENTES, MATERIALES Y METODOS**

### **5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO PILOTO**

El presente es un estudio piloto de tipo descriptivo con un tamaño de muestra de 30 casos en los cuales se realizará estudio del perfil proteómico del tejido hepático mediante técnica de SELDI-TOF. Del total de casos a estudiar, 20 casos corresponden a pacientes con MHCR intervenidos con intención curativa en el periodo comprendido entre diciembre 2004 y diciembre 2007. De estos 20 casos con MHCR, 10 corresponden a MHCR con comportamiento clínico agresivo (criterios de FONG 4 a 5) y 10 corresponden a MHCR con comportamiento clínico menos agresivo (criterios de FONG 0 a 1). Los 10 casos restantes del estudio corresponden a pacientes sanos (donantes cadavéricos para trasplante hepático). Todas las muestras provienen de la colección de tejidos hepáticos de la serie de muestras de tejido hepático de la Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático del Hospital Clínic (código de registro: Colecciones R121127-124, HCB-IDIBAPS).

### **5.2. RECURSOS**

Está compuesto por el Servicio de Cirugía Hepática y Trasplante de Hígado del Hospital Clínic de Barcelona, el Servicio de Bioquímica y Genética Molecular del Hospital Clínic de Barcelona y el Laboratorio del Centro de Investigación Esther Koplowitz. Disponen de un banco de Tejidos hepáticos de pacientes con su previo consentimiento informado, todo el material y equipamiento necesario para la realización del presente proyecto de investigación.

#### **Instalaciones y recursos de nuestro centro:**

- Laboratorio de análisis Bioquímico: centrífugas, neveras y congeladores.
- Área estéril
- Equipo general de biología molecular.

### **5.3. DATOS DE LOS PACIENTES:**

Los datos Clínicos, patológicos y la supervivencia (total y libre de enfermedad neoplásica) desde la resección colónica y hepática se obtendrán

de la base de datos de pacientes con MHCR que posee la Unidad de Cirugía Hepática y trasplante Hepático del Hospital Clinic. Tablas 4, 5 y 6.

**TABLA 4.- CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES**

	<b>GRUPO GRAVE (N= 10)</b>	<b>GRUPO LEVE (N= 10)</b>	<b>GRUPO CONTROL (N=10)</b>
<b>GÉNERO (M/F)</b>	7/3	7/3	6/4
<b>EDAD</b>	63,6 (48-80)	58,6 (45-76)	55,5 (28-74)
<b>NÓDULO POSITIVO EN TUMOR PRIMARIO</b>	10	0	-----
<b>INTERVALO POST QCO DE TUMOR PRIMARIO SIN MHCR &gt;12 month</b>	0	10	-----
<b>ANTIGENO CARCINOEMBRIONARIO (CEA) &gt;200 ng/ml</b>	6	0	-----
<b>NÚMERO DE NÓDULOS MHCR MAYOR A 1</b>	9 Entre 1 y 10 nódulos MHCR (media 4,6)	0  Todos únicos	-----
<b>TAMAÑO DE NÓDULOS &gt;5 cm.</b>	9  Entre 5 cm y 13,5 cm. (media 8,2 cm)	1  Entre 1,1 cm y 5,6 cm (media 3,1 cm)	-----
<b>SCORE DE FONG</b>	≥ 4 (5 casos Fong 4 y 5 casos Fong 5)	≠ (2 Casos Fong 1 y 8 casos Fong 0)	-----
<b>Mortalidad a los 2 años</b>	90%	0%	-----
<b>QUIMIOTERAPIA en el TRETAMIENTO DEL T. PRIMARIO PRE QUIRÚRGICO (RO)</b>	9	8	-----
<b>ENFERMEDAD METASTÁSICA EXTRAHEPÁTICA</b>	NO	NO	-----

**TABLA 5.- DATOS DE PACIENTES Y MUESTRAS ESCOGIDOS PARA EL ESTUDIO PROTEÓMICO (Grupo leve)**

Tejido Tumoral Casos de CA de Colon con Metástasis Hepática Agresividad LEVE	Criterios De FONG	Zinc. o Meta c.	M O R T A L I D A D	# N Ó D U L O S	L Ó B U L O S	C E A  > D E 200	P R O G  A D E N O P	Pro gres ión  < de 1 año	INV E X T  HEP	T A M A Ñ O  E N c m.	Edad	Género
7 T (L 1)	0	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	4,5	45	F
13 T (L 2)	1	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	5,6	68	F
51 T (L 3)	0	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	3,1	69	F
35 T (L 4)	0	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	3,2	57	M
40 T (L 5)	0	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	1,1	46	M
52 T (L 6)	0	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	1,1	58	M
55 T (L 7)	0	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	2,3	58	M
61 T (L 8)	1	M	NO	1	U	NO	SI	NO	NO	2,7	47	M
72 T (L 9)	0	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	2,5	62	M
86 T (L 10)	0	M	NO	1	U	NO	NO	NO	NO	4,0	76	M

**TABLA 6.- BASE DE DATOS DE PACIENTES Y MUESTRAS ESCOGIDOS PARA EL ESTUDIO PROTEOMICO (Grupo grave)**

Tejido Tumoral Casos de CA de Colon con Metástasis Hepática Agresividad ALTA	Criterios De FONG	Sinc. o Meta c.	M O R T A L I D A D	# N Ó D U L O S MHCR	L Ó B U L O S	C E A  > D E 200	P R O G  A D E N O P	Pro Gre sión  < de 1 año	INV E X T  HEP	T A M A Ñ A  E N c m.  PAT	Edad	Género
3 T (S 1)	5	S	SI	5	B	SI	SI	NO	NO	11,5	70	M
11 T (S 2)	4	S	SI	4	B	NO	SI	SI	NO	5,01	48	M
18 T (S 3)	4	S	NO	3	B	SI	SI	SI	NO	3,8	68	M
22 T (S 4)	4	S	SI	1	U	SI	SI	NO	NO	5,0	65	M
32 T (S 5)	4	S	SI	3	U	NO	SI	SI	NO	11,5	73	M
41 T (S 6)	5	S	SI	4	B	SI	SI	SI	SI		53	F
45 T (S 7)	4	S	SI	10	U	NO	SI	NO	NO	8,7	53	F
49 T (S 8)	5	S	SI	9	B	SI	SI	SI	SI	13,5	80	F
62 T (S 9)	5	S	SI	6	U	NO	SI	SI	SI	5,0	61	M
64 T (S 10)	5	S	SI	2	U	SI	SI	SI	NO	11	65	M

#### 5.4. MUESTRAS DE TEJIDO PARA EL ESTUDIO PROTEOMICO

Se trata de muestras de tejido hepático criopreservado a -198° procedentes de varios grupos:

- 1) Grupo de pacientes con MHCR en los cuales se predice un comportamiento neoplásico post-resección poco agresivo (criterios de Fong 0 a 1) (10 muestras de tejido hepático tumoral).
- 2) Grupo de pacientes con MHCR en los cuales se predice un comportamiento neoplásico post-resección agresivo (criterios de Fong 4 a 5) (10 muestras de tejido hepático tumoral).
- 3) Grupo de pacientes sanos (ausencia de CCR y MHCR) (10 muestras de tejido hepático normal).

## **5.5. PROCEDIMIENTOS PARA EL ESTUDIO PILOTO:**

### **5.5.1. CORTE Y PESO DE TEJIDO TUMORAL HEPATICO CONGELADOS.**

Se corta con bisturí estéril una porción de tejido tumoral de 50 mg procedente de muestras de MHCR congeladas. Las muestras de MHCR se conservan congeladas permanentemente. Esta técnica de manipulación evita la contaminación del tejido con los materiales utilizados.

Procedimiento de corte y peso y homogenización de muestras para estudio:

Los materiales que se utiliza:

- 1.- Los tubos para colocar el tejido hepático seleccionado cortado, pesado y previamente marcado para entregar para estudio. -
- 2.- Guantes estériles para manejar cada uno de los fragmentos tisulares. Se utilizó como mínimo un par de guantes nuevo por cada tubo a manipular.
- 3.- Un campo estéril para colocar el material a manipular el material de trabajo.
- 4.- Una caja de bisturís. Alcohol absoluto al 96° PURO.
- 5.- Una guía o plantilla donde se muestra la localización de cada tubo en CRIO, el número del tubo, el número como es identificado para el estudio (esto está previamente establecido).
- 6.- Los tubos que vienen de crio congelación con tejido tumoral hepático están sumergidos en nieve carbónica.

7.- Papel de aluminio obtenido de una caja nueva, manipulado únicamente con guantes estériles. El papel de aluminio cortado permanece colocado en hielo seco conservándose frío sobre una cuna de hielo (placa de petri sobre nieve carbónica). -

8.- Papel secante nuevo manipulado únicamente con guantes estériles y limpios. Sirve para limpiar la pinza con el alcohol y ser desechado posteriormente.

9.- Unas placas de peltre estériles nuevas colocadas sobre campo estéril. Dentro de ellas se coloca nieve carbónica para fabricar la cuna de hielo sobre la cual se coloca papel de aluminio que aísla el tejido. Sirve para realizar el pesaje.

10.- Pinzas para manipulación de tejido. Se limpian con alcohol absoluto y se utiliza material nuevo para cada tejido hepático a cortar.

11.- Una balanza de precisión previamente calibrada (tarada).

En la balanza se coloca el papel de aluminio para el tejido hepático cortado para su pesaje. Se pesa y traslada a la cuna de hielo habiendo obtenido el dato de su peso exacto. El paso en la balanza dura entre 2 y 3 segundos. El tejido con un peso de 50 mg se coloca en el tubo para estudio proteómico y este tubo es sumergido entre nieve carbónica.

Este procedimiento evita que se descongele el tejido hepático en el momento de su corte y pesaje. -

## **5.5.2. EXTRACCIÓN DE PROTEINAS:**

### **5.5.2.1. HOMOGENIZACIÓN (PREPARACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO)**

**Materiales:** Homogeneizador tipo Polytron, 0.5 mL de buffer U9 de Bio-Rad (9,5M urea, 2% CHAPS, 1% DTT, 50mM Tris-HCl, pH 9), rotador tipo Noria, ultracentrífuga, alícuotas de 50  $\mu$ L tipo Eppendorf, analizador de proteínas. Ver Figura 4.

Figura 4.



Figura 4. Polytron para homogenización de tejido tumoral a estudiar conbuffer U9 de Bio-Rad a una velocidad hasta 30.000 revoluciones por min. (Proceso que impide la desnaturalización o alteración de la proteína durante su estudio posterior).

Los 50 mg de tejido hepático congelado se someten a un proceso de homogenización mecánica mediante un homogeneizador tipo Polytron. El tejido homogenizado se incuba durante 1 hora a 4°C en un rotador tipo Noria y posteriormente se centrifuga a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C con. Las muestras homogenizadas se almacenan en alícuotas de 50  $\mu$ L de tipo Eppendorf a -80°C hasta el momento del análisis, obteniéndose de 5 a 6 alícuotas por cada muestra.

Se determina el total de proteínas contenidas en una alícuota con Nanodrop (instrumento que permite calcular la concentración de proteínas en una solución de solo 1  $\mu$ L mediante la absorbancia a 595 nm).

#### **5.5.2.2. OPTIMIZACION (SELECCIÓN DE FRACCIONES DE PROTEINAS DEL TEJIDO HOMOGENIZADO)**

Las alícuotas de tejido homogenizado se analizan en diferentes condiciones bioquímicas (a través del uso de diferentes arrays) obteniendo los parámetros que llevan a la determinación óptima y selectiva de varias fracciones de proteínas. En este procedimiento se obtienen 6 fracciones con grupos diferentes de proteínas, de los cuales se descartan 4 grupos que contienen proteínas comunes. Como resultado de la optimización se

seleccionan las fracciones F1 y F3 en los tres grupos arriba mencionados para el estudio de ambas fracciones con arrays CM10 e IMAC 30.

**Materiales:** PROTEIN CHIP SELDI SYSTEM Enterprise Edition, Buffer CM10, Buffer IMAC30, acetato de sodio, agua, sulfato de cobre, pipeta multicanal, multidispensadores para IMAC 30 y para CM10, alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  tipo Eppendorf, bioprocesador con arrays CM10, bioprocesador con arrays IMAC30.

El tejido hepático previamente homogeneizado y fraccionado (fracciones F1 y F3) se descongela dejándolo a temperatura ambiente. En el caso del array CM10 se introducen 60  $\mu\text{L}$  de Buffer CM10 en cada alícuota previamente identificada (excepto en las alícuotas denominadas blancas) y se colocan todas las alícuotas en el multidispensador para micro centrífuga según el orden establecido por el programa de informática del SELDI. En el caso del IMAC 30 se introducen 60  $\mu\text{L}$  de Buffer IMAC 30 en cada alícuota previamente identificada (excepto en las alícuotas denominadas blancas) que se colocan en el multidispensador para micro centrífuga según el orden establecido por el SELDI. En cada alícuota situada en los multidispensadores se introducen 40  $\mu\text{L}$  de muestra de tejido hepático homogeneizado según su indicación.

### **5.5.2.3. PREPARACION DE LA MEMBRANA CROMATOGRAFICA DE LOS SPOTS EN ARRAYS SELECCIONADOS (CM10 E IMAC30).**

En el caso de la membrana de los arrays IMAC 30 se realiza un primer paso introduciendo 50  $\mu\text{L}$  de sulfato de cobre en cada spot (porción que dará lugar a una señal identificable) de membrana, agitándose durante 10 minutos y descartándose el sobrante. Posteriormente se añaden 200  $\mu\text{L}$  de agua al spot de membrana, se agita durante 1 minuto y se descarta de nuevo el sobrante. Seguidamente se añaden 200  $\mu\text{L}$  de acetato sódico al spot, se agita durante 5 minutos y se vuelve a descartar el sobrante. Por último, se añaden 200  $\mu\text{L}$  de agua al spot, se agita durante 1 minuto y se descarta el sobrante. El segundo paso de preparación incluye la introducción de 200  $\mu\text{L}$  de Buffer IMAC 30 en cada spot de membrana de arrays IMAC

30, seguida de la agitación del bioprocesador durante 5 minutos y la eliminación de los excedentes de buffer al final.

En el caso de la membrana de los arrays CM10, solamente es necesario un primer paso que consiste en la introducción de 200  $\mu\text{L}$  de Buffer CM10 en cada spot de membrana de arrays CM10, seguida de la agitación del bioprocesador durante 5 minutos y la eliminación de los excedentes de buffer al final.

#### **5.5.2.4. PREPARACIÓN DE LA MATRIZ CON MOLÉCULAS ABSORBENTES DE ENERGÍA (E.A.M.)**

Se mezclan 50  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo y 50  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoracético al 1% en alícuotas con ácido cinapídico liofilizado, se centrifuga la mezcla a 14 revoluciones por minuto durante 10 minutos y se toma con pipeta 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla ya centrifugada dejando los gránulos del fondo (pellet) y descartándose la alícuota. En una nueva alícuota se colocan los 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla centrifugada a los que se añaden 50  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo y 50  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoracético al 1%. Todo este contenido formará la matriz con EAM para que las proteínas se desprendan de los arrays.

#### **5.5.2.5. PREPARACIÓN DE MEZCLAS DE PROTEINAS ESTÁNDAR PARA CALIBRAR EL SELDI TOF/MS**

Se llenan 2 alícuotas con 3  $\mu\text{L}$  de proteína estándar de alto peso molecular y 7  $\mu\text{L}$  de matriz en cada alícuota, lo que da lugar a una mezcla estándar de proteínas de peso molecular alto (MPA). De manera similar se llenan 2 alícuotas con 3  $\mu\text{L}$  de proteína estándar de bajo peso molecular y 7  $\mu\text{L}$  de matriz en cada alícuota, lo que da lugar a una mezcla estándar de proteínas de peso molecular bajo (MPB).



#### **5.5.2.6. PASO DE MUESTRAS DE TEJIDO HOMOGENEIZADO A LOS BIOPROCESADORES Y LAVADO**

Se coloca el contenido de cada alícuota en los multidispensadores de los bioprocesadores CM10 e IMAC 30 según el orden indicado para cada array y ambos bioprocesadores se incuban durante 1 hora en el agitador.

Posteriormente se realiza el lavado de los arrays en contenedores con 200  $\mu\text{L}$  de Buffer IMAC30 y CM10 dejándolos 5 minutos en cada contenedor y descartándose el líquido posteriormente. Se repite este paso tres veces para cada bioprocesador. Seguidamente se añaden 200  $\mu\text{L}$  de agua en cada contenido de IMAC 30 y CM10 y se descarta el líquido, repitiéndose este paso dos veces para cada bioprocesador.

#### **5.5.2.7. TRATAMIENTO CON SOLUCIÓN DE E.A.M. (Moléculas Absorbentes de Energía o matriz)**

Se abren los bioprocesadores y se sacan las carcasas de arrays, dejando secar completamente todos los spots de los arrays. Se coloca 1  $\mu\text{L}$  de matriz con EAM en cada spot seco y se repite el paso de secado. En los primeros 4 spots ubicados en los arrays situados en posición 10 de cada carcasa (de CM10 e IMAC30) que no han sido tocados en ningún momento por ningún producto o sustancia, se coloca 1  $\mu\text{L}$  de proteína estándar de la siguiente manera:

- Spot 10-1: 1  $\mu\text{L}$  de mezcla MPA
- Spot 10-2: 1  $\mu\text{L}$  de mezcla MPA
- Spot 10-3: 1  $\mu\text{L}$  de mezcla MPB
- Spot 10-4: 1  $\mu\text{L}$  de mezcla MPB

Figura 5.

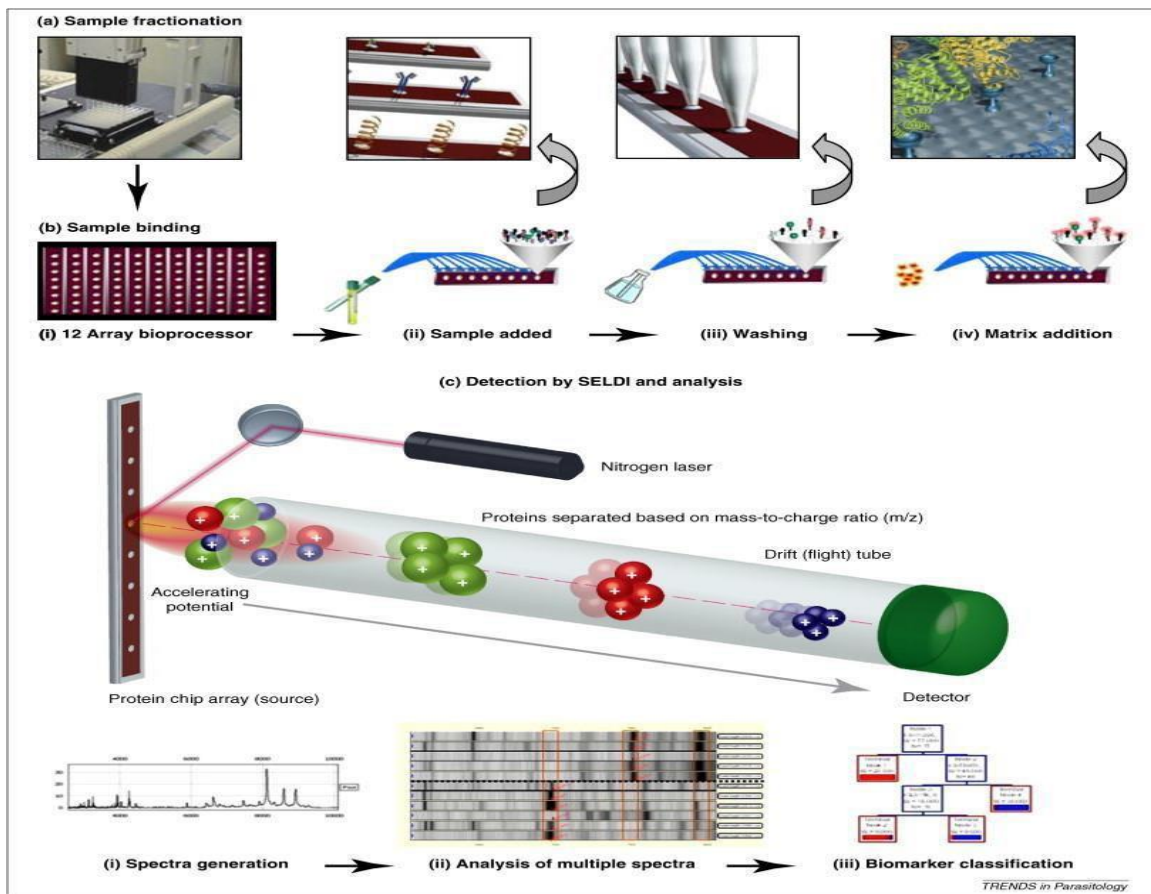


Figura 5 Preparación de spots para análisis en SELDI TOF/MS, paso de spots por SELDI TOF/MS y lectura de proteínas por TOF/MS, Interpretación en picos (Concentración en  $\mu\text{A}$  e identificación de proteína en Da. de acuerdo a su velocidad a través del TOF/MS hacia el detector) por software de SELDI TOF/MS.

Author: Momar Ndao, Adam Rainczuk, Marie-Claire Rioux, Terry W. Spithill, Brian J. Ward. Is SELDI-TOF a valid tool for diagnostic biomarkers? Trends in Parasitology, Volume 26, Issue 12, p561-567, December 2010

### 5.5.3. LECTURA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS IDENTIFICADAS POR SU PESO MOLECULAR EN DALTON Y LAS CONCENTRACIONES INTERPRETADAS EN PICOS POR CADA NIVEL DE CONCENTRACION

Se colocan las carcasas con los arrays en el SELDI para la lectura de las membranas cromatográficas con láser en cada spot. Cada spot es fraccionado en tres partes iguales y cada fracción tiene un localizador de masa distinto para optimizar la captación o lectura cromatografía según el peso molecular de la proteína. El software del SELDI está diseñado para optimizar la lectura de los resultados con los siguientes pasos:

- **Selección**
- **Normalización:** ajusta la intensidad de los picos y descarta todos aquellos picos que no están dentro de los patrones normales con respecto al grupo.
- **Alineación:** alinea todos los picos con los mismos pesos moleculares.
- **Calibración:** estandarización de los picos proteicos basándose en proteínas determinadas de las que se le conoce su peso molecular exacto.
- **Optimización de línea base:** alinea la parte inferior de los picos con la línea base.
- **Identificación:** En este paso se colocan colores distintos a los tres grupos de pacientes para facilitar su identificación en base al grupo pronóstico: L (leve, color azul), S (severo, color rojo) y control (color verde).

Figura 6

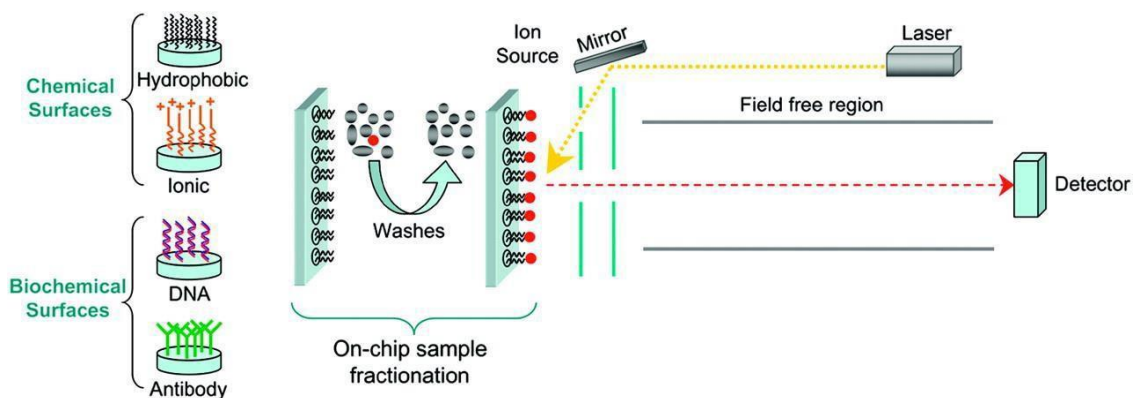


Figura 6: SELDI TOF/MS Arrays con membranas cromatográficas específicas

Se han diseñado sistemas ProteinChip con matrices que contienen superficies químicamente o bioquímicamente tratadas. La muestra, que consiste en extractos brutos o mezclas de proteínas enteras, se aplica a la superficie. Después de una serie de lavados, las proteínas diana se retienen selectivamente. Se añade una solución absorbente de energía a la superficie y la muestra se somete a ionización por desorción por láser, lo que separa las proteínas de los spots hacia el detector de iones. Los iones formados se miden a su paso a través del TOF/MS donde son reconocidas estas proteínas por su peso molecular en Dalton (Da) usando un analizador de masa TOF.

Autor: Ileana M. Cristea, Simon J. Gaskell and Anthony D. Whetton, Proteomics techniques and their application to hematology. Blood, 2004 103: 3624-3634.

<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/103/10/3624/F4.large.jpg?sso-checked=true>

#### **5.5.4 ANALISIS ESTADÍSTICO DE ESTUDIO PILOTO**

El análisis de datos se fundamentó en establecer un perfil proteico característico en los diferentes grupos incluidos en el estudio. En busca de un perfil proteómico que diferencia el grupo de pacientes sanos del grupo de pacientes con MHCR. Identificar un perfil proteómico característico del grupo de pacientes leves y de los pacientes graves según los criterios pronósticos de Fong.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U o la prueba de Fisher cuando fue apropiado. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SE y los valores P inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

Todos los análisis estadísticos clínicos se realizaron con PASW Statistical Package Versión 18.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Los datos proteómicos cuantitativos se analizaron usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

Por último, se realizó un análisis CART (Análisis de Árbol de Regresión y Clasificación) utilizando los Patrones de Biomarcadores (Bio-Rad) para detectar los picos de proteína con mayor contribución para discriminar a ambos grupos.

### **5.6 ESTUDIO PARA VALIDACIÓN**

#### **5.6.1 PACIENTES, MATERIALES Y METODOS**

Para la validación del estudio se tomaron muestras tumorales de MHCR en 85 pacientes para evaluar la posible existencia de una firma o patrón proteómica distintivo entre MHCR "leve" o "grave" basado en la supervivencia a los 5 años. Se caracterizó por SELDI-TOF-MS y posteriormente se realizó un análisis de clasificación y árbol de regresión (CART)

El análisis CART permite la detección de pacientes MHCR graves: Para medir el impacto de todos los picos de proteína detectados e identificar aquellos con mayor poder discriminatorio, se utilizó un procedimiento no paramétrico basado en los datos normalizados obtenidos por SELDI-TOF-MS. Se generó un análisis CART con 5 nodos terminales y se consideró que la combinación de cuatro picos de proteínas diferentes era la más relevante

para construir el algoritmo de diagnóstico.

## **PACIENTES.**

Los pacientes ingresados en la Unidad de Cirugía Hepatobiliar programadas para resección de MHCR de abril de 2005 a marzo de 2012 fueron considerados para este estudio prospectivo y fueron seguidos de acuerdo a las directrices institucionales. Se obtuvieron todos los datos clínicos y patológicos de la base de datos prospectiva y fichas clínicas de la Unidad de Cirugía Hepática y se seleccionaron sólo los pacientes que pudieran ser incluidos en un grupo pronóstico específico según el tiempo de supervivencia. Así fueron estudiados un total de 85 casos con MHCR. Los criterios de exclusión fueron haber tenido una cirugía de resección de MHCR previa a la realizada al momento de tomar la muestra tumoral utilizada en el estudio.

Los regímenes de quimioterapia utilizados antes de las resecciones hepáticas se basaron en el 5-fluorouracilo sólo o asociado con irinotecán u oxaliplatino de acuerdo con los protocolos locales. Los pacientes fueron clasificados en base a su resultado a largo plazo. Por lo tanto, los pacientes fueron considerados como "leves" si su tiempo de supervivencia fue más largo de cinco años o "grave" si era menor a 5 años. Se obtuvieron muestras de sangre venosa de todos los pacientes MHCR después del ayuno. Las muestras de suero extraídas se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se midieron varios parámetros del suero, incluyendo alanina transaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), albúmina, bilirrubina o creatinina entre otros, con el instrumento ADVIA 2400 (Siemens Health care Diagnostics, Tarrytown, NY, EE.UU.). Los niveles séricos de CEA se determinaron usando el sistema de inmunoensayo ADVIA Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics).

### **5.6.2 DISEÑO DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN.**

El diseño del segundo estudio fue doble. En primer lugar, en un conjunto de 57 pacientes con MHCR evaluamos si el perfil proteómico del tejido de los pacientes leves difiere del de los pacientes graves. También se analizaron los exámenes de rutina hepática y renal en estos pacientes. Posteriormente, muestras de tejido hepático de 28 pacientes con MHCR

también se recogieron e incluyeron en el grupo de validación ciego para confirmar los resultados obtenidos.

### **5.6.3 RESECCIÓN DE MHCR Y RECOLECCIÓN DEMUESTRAS**

Todas las muestras de tejido metastásico de pacientes con resección curativa de MHCR se recogieron y se crio preservaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron congeladas hasta un análisis posterior.

### **5.6.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA HEPÁTICA Y FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS A PARTIR DE HOMOGENADOS HEPÁTICOS**

Se usó aproximadamente 50 mg de tejido tumoral hepático conservado en hielo seco y previamente tratado con el mismo procedimiento que se utilizó para corte y pesaje en el estudio piloto. Se solubilizó mediante homogeneización en 500  $\mu$ l de tampón de urea (urea 9,5 M, CHAPS al 2%, DTT al 1%, 50 mM Tris - HCl, pH 9) con el uso del polytron. Posteriormente, los homogenados de tejido se incubaron en un mezclador giratorio durante 1 hora a 4°C y el material insoluble se retiró por centrifugación (16.000 x g, 4°C durante 15 min). Posteriormente, las muestras se dividieron en alícuotas y se mantuvieron a -80°C hasta que se efectuó el fraccionamiento de la proteína.

En resumen, las muestras se fraccionaron mediante pH, utilizando una placa de filtración de 96 pocillos (Pall Corp., Port Washington, NY) con 200  $\mu$ l de un soporte de intercambio de aniones Q de macro preparación (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) en cada pocillo. Se eliminó el flujo por filtración al vacío. Posteriormente, cada pocillo se lavó dos veces con 200  $\mu$ l de agua destilada y se equilibró con 200  $\mu$ l de tampón de rehidratación (Tris-HCl 50 mM, pH 9). Los pocillos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, cada pocillo se equilibró tres veces con 200  $\mu$ l de un tampón de equilibrado [Urea 1 M, CHAPS al 0,2% (p / v), Tris-HCl 50 mM, pH 9].

Antes del fraccionamiento, se mezclaron 20  $\mu$ l de homogeneizados tisulares con 30  $\mu$ l de tampón de urea [urea 9 M, CHAPS al 2% (p / v), Tris-HCl 50 mM, pH 9] en una placa de fondo en V de 96 pocillos 20 minutos a 4°C en un agitador de microplaca orbital horizontal. Las muestras se diluyeron a continuación con 50  $\mu$ l de tampón de equilibrio, se transfirieron

a cada pocillo y se incubaron durante 30 min. A 4°C con agitación. Todas las muestras se lavaron de una manera escalonada alterando el pH del tampón de lavado. Se obtuvieron seis fracciones diferentes. El flujo fue recogido por filtración al vacío en micro placas de fondo V y todos fueron almacenados a -80°C hasta el análisis proteómico.

### **5.6.5 PROCESAMIENTO PROTEÓMICO DE MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO**

El perfil de proteínas se analizó mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción / ionización con láser mejorado en superficie (SELDI-TOF-MS) utilizando el sistema de ProteinChip de ocho puntos (Bio-Rad). En un estudio preliminar para optimizar las condiciones experimentales, 2 muestras agrupadas de pacientes MHCR leves y pacientes MHCR graves fueron fraccionadas y las seis fracciones obtenidas se cargaron en tres tipos diferentes de matrices ProteinChip que tenían afinidad de unión a proteína diferente: Matrices de intercambio de cationes débiles (CM10), matrices de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC30) y matrices hidrofóbicas / inversas (H50). El perfil de proteína resultante de cada grupo se comparó y la fracción número 3 usando la matriz ProteinChip CM10 mostró el mayor número de picos detectados, la intensidad de señal total más alta y las principales diferencias entre los grupos cuando se compararon con todas las otras fracciones y matrices ProteinChip. Así, la fracción número 3 y la matriz de ProteinChip de CM10 se seleccionaron para los estudios subsiguientes. Antes de la carga de la muestra, los puntos se equilibraron dos veces con 200 µl de un tampón de acetato de sodio (acetato de sodio 0,1 M, pH 4).

Mientras tanto, 40 µL de la muestra fraccionada se mezclaron con 60 µl de tampón de acetato de sodio y esta mezcla (100 µl) se cargó posteriormente aleatoriamente y se incubó durante 1 hora en un agitador a temperatura ambiente. Posteriormente, las matrices CM10 ProteinChip se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de acetato sódico durante 5 minutos en un agitador a temperatura ambiente y dos veces con agua desionizada con el fin de eliminar las proteínas no unidas. Posteriormente, las matrices se secaron al aire y se añadieron dos veces a cada mancha 1 µl de matriz absorbente de energía (ácido sinapínico saturado en una solución

acuosa que contenía acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 0,5%). La superficie se dejó secar al aire entre cada aplicación. Finalmente, ProteinChips se leyeron en el lector ProteinChip PBS II (Bio-Rad).

### **5.6.6 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS**

En resumen, cada punto se analizó a tres intensidades de láser de energía diferentes: 2.500 nJ, 3.000 nJ y 3.500 nJ y se estableció la relación masa-carga ( $m/z$ ) de  $m/z$  1.000 a 25.000 para la intensidad del láser de baja energía, Entre  $m/z$  2.500 y 200.000 para la intensidad láser de energía media y de  $m/z$  5.000 a 200.000 para la intensidad láser de alta energía. Además, la resolución de pico se centró a  $m/z$  5.000, 12.000 o 19.000 según intensidad de láser de baja, media o alta energía, respectivamente.

Los espectros de proteínas se calibraron usando dos estándares de calibración externos diferentes (patrón de péptido todo-en-uno y estándar de proteína todo-en-uno, Bio-Rad Laboratories), y posteriormente se normalizaron por la corriente total media de iones en todo el grupo. Con el fin de minimizar los valores atípicos, se suprimieron todos los espectros que difieren al menos por el doble de la desviación estándar de la media. También se definieron los ajustes de la línea de base, los parámetros de selección de pico tales como la relación señal / ruido mínimo, la profundidad del valle y el error  $m/z$ .

Posteriormente, todos los clústeres de picos de proteínas identificados automáticamente se verificaron manualmente. Re etiquetado, eliminación o adición de picos se realizó cuando era necesario.

### **5.6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ESTUDIO PARA VALIDACIÓN.**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el mismo software y procedimiento utilizado en el estudio piloto. El análisis se fundamentó en hallar perfiles proteómicos diferentes basados en la supervivencia a 5 años.

Por último, se realizó un análisis CART (Análisis de Árbol de Regresión y Clasificación) utilizando los Patrones de Biomarcadores (Bio-Rad) para detectar los picos de proteína con mayor contribución para discriminar a ambos grupos (supervivencia mayor a 5 años y supervivencia menor a 5 años).





## RESULTADOS

---

---

## **6.- RESULTADOS**

### **6.1 RESULTADOS ESTUDIO PILOTO (Primer artículo)**

#### **Prognostic prediction by liver tissue proteomic profiling in patients with colorectal liver metastases.**

Como ya señalamos en este primer trabajo, el objetivo fue encontrar perfiles proteicos diferenciales en pacientes con MHCR y se demostró que existe una relación entre los perfiles proteómicos encontrados con el uso de la tecnología SELDI TOF/MS y los índices pronósticos clínicos de FONG de los grupos seleccionados para el estudio. Este estudio tiene el fin de encontrar marcadores proteómicos específicos que ayuden a predecir el pronóstico de los pacientes con MHCR.

En el estudio proteómico con tecnología SELDI-TOF-MS de 20 muestras de pacientes con MHCR que cumplían los criterios de inclusión y diez muestras de hígado en pacientes sanos, se detectaron 73 picos de los cuales 42 fueron significativamente diferentes entre los tres grupos de pacientes (grupo control, grupo de pronóstico leve y grupo de pronóstico grave) ( $P < 0,05$ ).

Al final del estudio, se analizaron 10 casos con hígado sano, 10 casos de pacientes de pronóstico leve y 8 pacientes con pronóstico grave. Por otra parte, se utilizó un algoritmo (CART) para construir un árbol de clasificación (patrones de biomarcadores de software) para predecir la agresividad del tumor.

Se generaron árboles de clasificación con la combinación de diferentes picos de proteína a partir de los espectros generados para distinguir mejor los dos grupos e identificar un posible grupo de proteínas que podrían ser utilizadas para predecir la agresividad del tumor.

#### **Diferencias de picos proteicos entre grupo control y grupo de pacientes con MHCR:**

La diferencia más clara entre el grupo control y los grupos con MHCR fueron detectados en la fracción 1 analizado en matriz de ProteinChip IMAC30 en el que se encontró un pico de proteína con m/z de 7371D. (P

<0.0001), Esta proteína se encontró casi suprimida en pacientes con MHCR en comparación con el grupo control. Específicamente, la intensidad pico de la  $m/z$  7371 variaba entre 20,4 y 84,7 micro amperios ( $\mu A$ ) en el grupo control sano. Sólo en uno de cada diez de los pacientes con MHCR expresó la intensidad  $m/z$  7371 dentro del mismo intervalo del grupo control. Se establece el valor de corte del pico de la proteína con  $m/z$  7371 en 12,4  $\mu A$ , lo que dio una sensibilidad del 94,1%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo de 90,9%.

En el estudio de la fracción 3 con matriz de ProteinChip CM10 se detectó un pico de proteína localizada en 7929  $m/z$ , el cual mostró muy bajos niveles o estar suprimida en los casos de pacientes con MHCR en comparación con los casos de pacientes sanos ( $p < 0,001$ ).

### **Picos que diferencian los perfiles proteómicos en los dos grupos pronósticos de pacientes con MHCR**

Se encontraron diferencias significativas en los mapas de proteínas entre los grupos con MHCR leves y graves (basados en los criterios de Fong). Fueron detectadas 21 proteínas que mostraron diferencias entre los dos grupos con valores  $p$  significativos.

Después de la validación cruzada 10 veces, se generó un árbol de clasificación de 4 nodos que fue capaz de distinguir el grupo control, los pacientes con pronóstico leve y pronóstico grave por la combinación de los picos situados a  $m/z$  1789, 2970, 2871 Da, obteniendo una curva ROC de 0,994, 0,947 y 0,952 respectivamente. La primera proteína a considerar era la ubicada a  $m/z$  2970 Da. Esta proteína fue útil para separar el tipo de MHCR leve de las MHCR graves ( $p < 0,051$ ). De hecho, todos los pacientes que presentaron la menor intensidad superior a 7,6 microamperios ( $\mu A$ ) se consideraron pacientes con comportamiento leve mientras que los que presentan esta proteína superior a este corte eran en su mayoría del grupo grave. Para mejorar la precisión del árbol de clasificación, se utilizó otro pico de proteína, el pico de  $m/z$  2871 Da con punto de corte de 187  $\mu A$ , para separar mejor los grupos de MHCR leves y MHCR graves con el uso de esta combinación, sólo 1 paciente leve fue no clasificado por el árbol de

clasificación y aportó una curva ROC y algoritmo con una sensibilidad del 100 % y especificidad del 90 %. (Figura 7, 8 y fig. 2 en el artículo).

De los 73 picos de proteínas detectados en el estudio, en la fracción 3 con el array proteinChip CM10 se detectaron 4 picos con diferencias significativas entre los grupos con MHCR, sin embargo, ninguno de estos picos define claramente una identidad para cada grupo de MHCR (leve o grave).

Con el uso de ProteinChips IMAC30 en la fracción 1, se ha identificado un pico situado a m/z 2462Da. que mostró una diferencia clara entre los grupos control y el grupo con MHCR ( $p < 0.005$ ) y la proteína localizada en m/z 3446 Da. mostró diferencia clara entre los grupos con MHCR leves y MHCR graves ( $p < 0,005$ ). Al combinar esta imagen de picos en los casos con pronóstico leve y pronóstico grave, se obtuvo una curva ROC de 0,971, 0,944 y 0,849 respectivamente (Figura 9, 10, 11); el punto de corte en estos picos es bajo (7,0  $\mu\text{A}$  y 21  $\mu\text{A}$ ), por lo tanto, no se considera un hallazgo muy importante a pesar de su alta sensibilidad y especificidad.

#### TABLA 7

RESULTADOS: Picos estadísticamente significativos que discriminan a los casos del grupo control frente a los casos con MHCR y al grupo Leve frente al grupo grave.

Picos	Tipo de ProteinChip array	CORRELACIÓN CLÍNICA	SOBRE EXPRESIÓN	Línea de corte	CURVA ROC	p-value
<b>m/z 2,970 Da</b>	F3 CM10	<b>Leve/grave</b>	<b>Leve</b>	7,6 $\mu\text{A}$	0,950	
<b>m/z 2,871 Da</b>	F3 CM10	<b>Leve/grave</b>	<b>grave</b>	187 $\mu\text{A}$	0.994	
<b>m/z 7,929 Da</b>	F3 CM10	<b>Control/MHCR</b>	<b>Control</b>	10,1 $\mu\text{A}$	0.947	<0,001
<b>m/z 7,371 Da</b>	F1 IMAC30	<b>Control/MHCR</b>	<b>Control</b>	12,1 $\mu\text{A}$	0.971	<0.0001
<b>m/z 2,462 Da</b>	F1 IMAC30	<b>Control/MHCR</b>	<b>Control</b>	7,0 $\mu\text{A}$	0.944	<0.005
<b>m/z 3,446 Da</b>	F1 IMAC30	<b>Leve/grave</b>	<b>Leve</b>	21 $\mu\text{A}$	0.849	<0.005

**TABLA8**

RESULTADOS: Picos estadísticamente significativos que discriminan el grupo grave frente al grupo Leve.

Tipo de ProteinChip array	m/z	p-value	Sobre expresión
CM10	2492	<0.01	grave
	3446	0.026	Leve
	4230	0.021	grave
	10222	0.016	grave
IMAC30	3369	0.043	Leve
	6193	0.043	grave
	8291	0.027	grave
	8426	0.034	grave
	8642	0.043	grave
	9533	0.043	grave
	12581	<0.01	grave
	13818	0.012	grave
	18106	0.034	grave
	18420	0.043	grave
	20511	0.034	grave
	20938	<0.005	grave
	21439	<0.005	grave
	22041	0.012	grave
	22323	0.012	grave

Figura 7

Picos 2970 y 2871 Da de Fracción 3 analizados con arrays CM10.

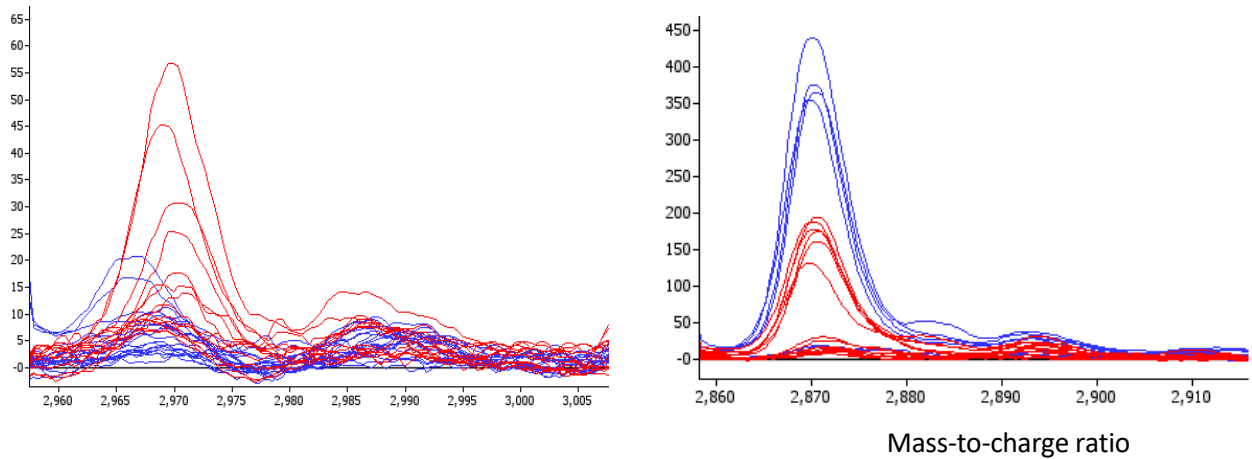


Figura 8

Árbol de clasificación muestra pico 2970 y pico 2871 en CM10 Fracción 3 muestran diferencias entre los casos del grupo leve y los casos del grupo grave. Curva ROC Sensibilidad = 100%, Especificidad = 90%, PPV = 88'9%, NPV = 100%

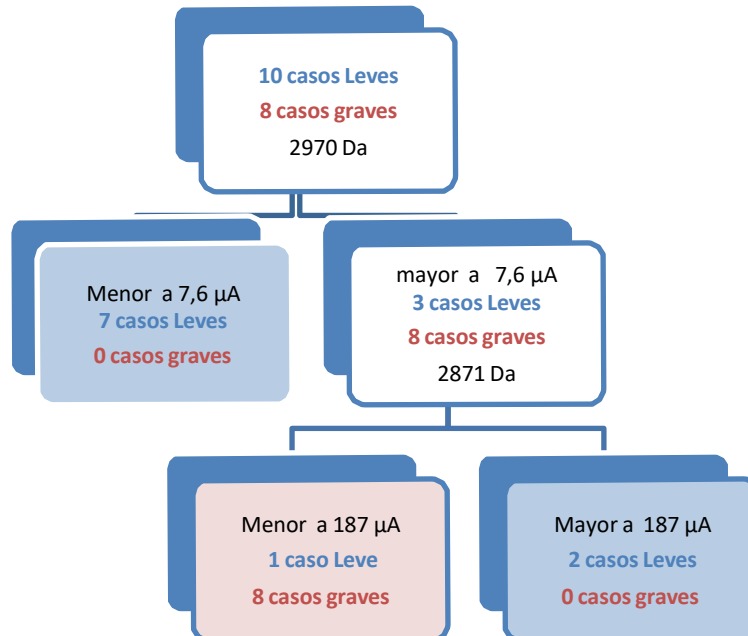


Figura 9

Pico 3.446, F1 IMAC30

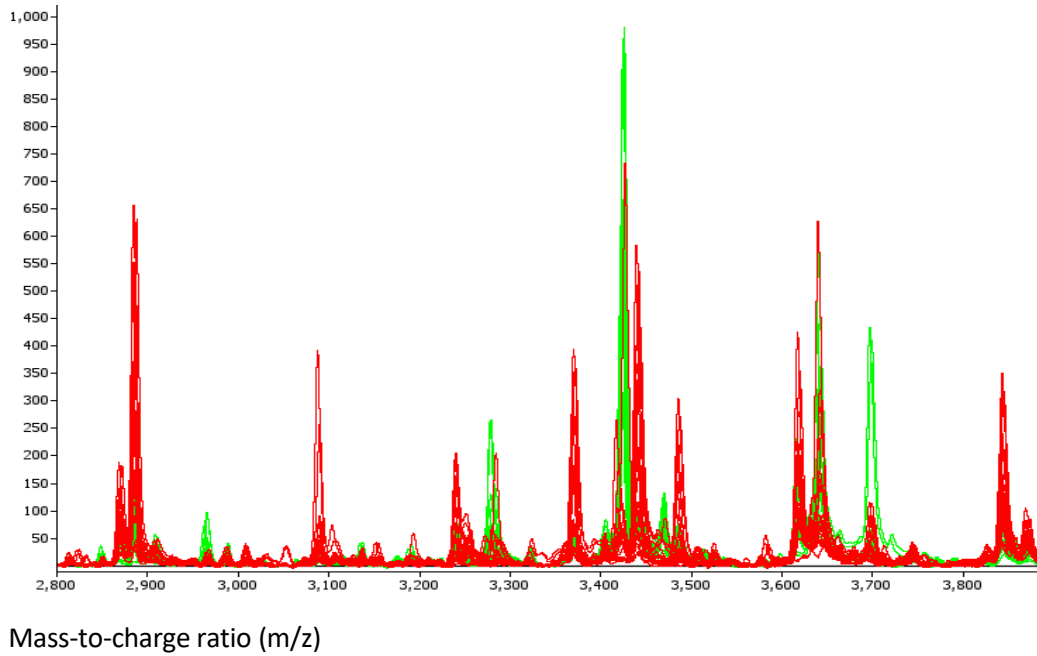


Figura 10



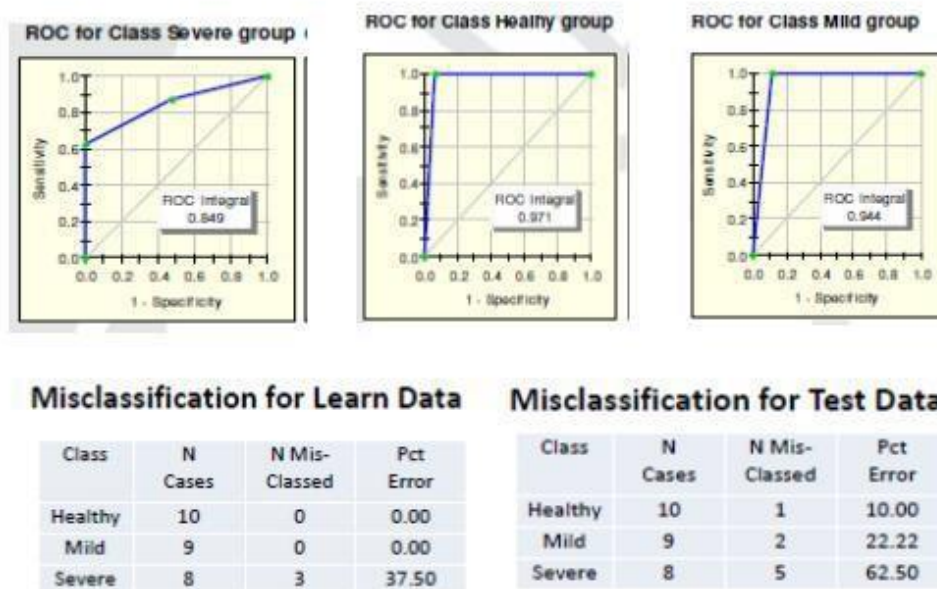
Figure 10 Árbol de Clasificación IMAC30,

1, pico 2462 muestra diferencias entre el control y el grupo de casos con MHCR. El pico 3238 muestra diferencias entre grupo leve y el grupo grave. Sensitivity = 100%, Specificity = 95%



Figura 11

Resultados F1 IMAC30



## PRELIMINARY COMMUNICATION

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

# Prognostic prediction by liver tissue proteomic profiling in patients with colorectal liver metastases

Adalgiza Reyes<sup>1</sup>, Josep Martí<sup>1</sup>, Santiago Marfà<sup>2</sup>, Wladimiro Jiménez<sup>2,3</sup>, Vedrana Reichenbach<sup>2</sup>, Amalia Pelegrina<sup>1</sup>, Constantino Fondevila<sup>1</sup>, Juan Carlos Garcia Valdecasas<sup>1</sup> & Josep Fuster<sup>\*1</sup>

**Aim:** To obtain proteomic profiles in patients with colorectal liver metastases (CRLM) and identify the relationship between profiles and the prognosis of CRLM patients. **Materials & methods:** Prognosis prediction (favorable or unfavorable according to Fong's score) by a classification and regression tree algorithm of surface-enhanced laser desorption/ionization TOF-MS proteomic profiles from cryopreserved CRLM (patients) and normal liver tissue (controls). **Results:** The protein peak 7371 *m/z* showed the clearest differences between CRLM and control groups (94.1% sensitivity, 100% specificity,  $p < 0.001$ ). The algorithm that best differentiated favorable and unfavorable groups combined 2970 and 2871 *m/z* protein peaks (100% sensitivity, 90% specificity). **Conclusion:** Proteomic profiling in liver samples using classification and regression tree algorithms is a promising technique to differentiate healthy subjects from CRLM patients and to classify the severity of CRLM patients.

First draft submitted: 13 October 2016; Accepted for publication: 9 December 2016; Published online: 16 January 2017

The liver is the most commonly affected organ by distant metastases from colorectal cancer [1,2]. Recent advances in chemotherapy have expanded the possibilities to undergo surgery for colorectal liver metastases (CRLM) with complete resection (R0) intent, which is nowadays the only accepted curative treatment. However, the current overall 5-year survival after CRLM resection ranges between 30 and 60% and the recurrence rate remains still high [3–5]. Prognosis of patients with CRLM has been classically well estimated with clinical prognostic scores like the Fong's score and Nordlinger score [6,7], despite nowadays these prognostic tools are limited to assess the individual patient risk because they do not take into account the latest medical developments to treat CRLM [8].

One of the strategies to overcome the limitations of clinical risk scores is to find biomarkers that, alone or in combination with clinical characteristics, improve the prognostic sensitivity of current scores, lead to an early diagnostic and help with the choice of the best treatment. Indeed, the latest technological advances like proteomic profiling have enabled the finding of new neoplastic biomarkers and have improved the diagnostic and prognostic possibilities in these patients [9–11]. Proteomics is the study of proteome (a set of proteins expressed in a particular cell under environmental conditions and specific developmental stage) and specifically consists in analyzing the quantity, structure, function and regulation of protein expression through the expression profiles of these proteins in serum, tissue or other biological substances [12]. In the case of CRLM, several

## KEYWORDS

- biomarker • colorectal cancer • liver metastases
- outcomes research
- prognosis • proteomic analysis

<sup>1</sup>Liver Surgery & Transplantation Unit, Department of Surgery, ICMDM, Hospital Clinic, IDIBAPS, CIBERehd, Villarroel, 170, 08036, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Biochemistry & Molecular Genetics Service, Hospital Clinic, IDIBAPS, CIBERehd, Villarroel, 170, 08036, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Physiological Sciences Department I, University of Barcelona, Casanova, 143, 08036, Barcelona, Spain

\*Author for correspondence: Tel.: +34 93 227 54 00; Fax: +34 93 227 98 07; [jfuster@clinic.cat](mailto:jfuster@clinic.cat)

**PRELIMINARY COMMUNICATION** Reyes, Marti, Marfa *et al.*

studies have analyzed the proteomic expression and attempted to find proteins that could be counteracted with chemotherapy agents [13–18]. However, few studies have attempted to relate proteome expression and neoplastic prognosis in patients with CRLM [17,18], something that would help to guide their clinical management.

In the present study we aimed to find differential protein profiles in patients with CRLM and identify the relationship between these protein profiles and the clinical prognostic indices in order to find specific markers that would help to predict the prognosis of patients with CRLM.

---

**Materials & methods****• Study design**

This study uses samples of metastatic tissue from patients undergoing curative resection of CRLM following standard institutional guidelines [19]. After obtaining the approval from the Ethics Committee at our Institutional Review Board for Clinical Research, we reviewed all patients who consented before CRLM resection to have metastatic samples collected and stored for future research projects from 2004 to 2007 (Registration Code: R121127124 Col-lecciones, HCBIDIBAPS). We obtained all clinical, pathological and follow-up data from the Liver Surgery Unit prospective database and clinical charts, and selected only the patients who could be included in a specific prognostic group according to Fong's score [7]. Patients with a score of 0 or 1 point were included in the favorable prognosis group and patients with a score of 4 or 5 points were included in the unfavorable prognosis group. On the other hand, we also obtained liver tissue samples from liver donors at the time of procurement to serve as a control group.

for 20 min at 4°C to remove insoluble pellet. Finally, protein extracts were stored in 50 µl aliquots at -80°C (5–6 aliquots for each liver sample) until further analysis. Furthermore, we used 15 µl of protein extracts from each patient and obtained three different 150 µl pools corresponding to the favorable, unfavorable and control groups (15 µl/sample × 10 samples from each group) to optimize the surface-enhanced laser desorption/ionization TOF-MS (SELDI-TOF-MS) acquisition parameters of the proteomic profiles. We performed two technical replicates for each sample and obtained three independent measures from each spot.

Protein extracts were fractionated by pH using a high-throughput fractionation process to enrich low-abundance proteins. As previously described by our group [20], a 96-well microplate format with Q ceramic HyperD F anion-exchange beads (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) was used and 20 µl of each protein extract mixed with 30 µl of U9 buffer was added to each well. After 1 h of incubation, all samples were eluted in a stepwise manner by altering the pH of the wash buffer until collection of six different fractions. These fractions from each protein extract were stored at -80°C until proteomic analysis. We fractionated each pool into seven different wells to evaluate the reproducibility of the method. Moreover, a pooled hepatic tumor sample from the 20 CRLM patients was obtained and treated as the other samples. In total, it was processed independently nine-times and subsequently analyzed. Based on the protein peaks detected in the *m/z* 1000–25,000 range, the intra-assay (spot-to-spot) maximum CV was 29.38% for peak intensity and 0.09% for mass accuracy.

Protein profiles were obtained by SELDI-TOF-MS using the eight-spot format ProteinChip arrays (Bio-Rad Laboratories). In a preliminary study to optimize the experimental conditions, all different fractions obtained from each pool were analyzed on several arrays that had different protein-binding affinity depending of the physicochemical properties of the proteins (weak cation exchange arrays [CM10], hydrophobic/reverse-phase arrays [H50] and immobilized metal affinity chromatography arrays [IMAC30]). Briefly, each array was pre-equilibrated according to manufacturer's instruction. Forty microliter of each fraction was mixed with 60 µl of the binding buffer and spotted on the array. After 1 h of incubation

- **Samples processing**

We used 50 mg of frozen hepatic tumor from each CRLM patient and 50 mg of liver tissue from each healthy control. Liver samples were cryopreserved immediately after collection and kept at this temperature before transport and preparation for the proteomic analysis. Both types of samples were mechanically disrupted with a polytron homogenizer in 0.5 ml of U9 buffer (9 M urea, 2% CHAPS, 1% DTT, 50 mM/l Tris-HCl, pH 9.0) and then solubilized in Eppendorf tubes on ice. Protein extracts were incubated in a rotator at 4°C for 1 h and they were subsequently centrifuged at 16,100 × *g*

in the shaker, each spot was washed twice with binding buffer for 5 min and followed by deionized water. Finally, 1  $\mu$ l of sinapinic acid in 50% acetonitrile and 0.5% trifluoroacetic acid was deposited twice on the array spot. The arrays were read with the ProteinChip PBS II reader (Bio-Rad) and all protein profiles were processed with the ProteinChip Data Manager Client 4.1 software (Bio-Rad). The number of peaks observed in the spectra, the intensity and the separation between peaks (resolution), the S/N value, and the differences in protein expression pattern between each pool in the same array and fraction were evaluated in order to select the optimal conditions to analyze individual patient sample. After the preprocessing steps of the raw spectra (noise reduction and smooth, baseline subtraction, peak detection, alignment and calibration, ion intensity normalization), fraction number 1 analyzed on the IMAC-30 ProteinChip array was selected to compare healthy controls and CRLM patients as it showed the highest number of peaks detected and the highest total signal intensity compared with other arrays. Similarly, fraction number 3 using the eight-spot format CM10 ProteinChip arrays was used to compare favorable and unfavorable CRLM patients.

In order to classify patients and predict their neoplastic prognosis we used a nonparametric algorithm based on simple combinations of patient's characteristics and differences between proteomic profiles. Briefly, we entered all protein peak intensities from healthy controls and CRLM patients into the Biomarkers Patterns Software (Bio-Rad) and an initial training samples set was selected. The analysis software defined a single splitting rule that best segregated this training set by characteristics and then the software repeated this process with each proteomic peak. This led to a decision tree that

described the best set of rules to organize the samples according to patients' characteristics. Finally, after a tenfold cross-validation, the optimal classification and regression tree (CART) model with the minimum relative number of peaks was chosen.

Statistical analyses were performed by unpaired Student's *t*-test or Mann–Whitney *U* test when appropriated, based on the results obtained from D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Results are expressed as mean  $\pm$  SE and *p*-values lower than 0.05 were considered significant.

## Results

### • Characteristics of patients & classification

We included 20 samples from CRLM patients that fulfilled the inclusion criteria, with ten patients in the favorable group and ten patients in the unfavorable group. The number of patients included in the control group was ten. No patient had any associated disease moreover of CRLM that could alter the neoplastic prognosis. The characteristics from patients in each group are shown in **Table 1**.

### • Healthy controls versus CRLM patients

We analyzed a total of 30 tissue samples using SELDI-TOF-MS technology. Three tissue samples from CRLM patients were excluded from the analysis because of technical inadequacies of the MS spectra. Among the 27 samples, we detected 73 peaks but only 42 of these peaks were significantly different ( $p < 0.05$ ) when comparing samples from controls and CRLM patients. From these 42 peaks, we selected the ones with the lowest *p*-values ( $p < 0.0001$ ) (**Table 2**). The clearest differences between healthy controls and CRLM patients using IMAC30 ProteinChip arrays were detected on the protein peak with an *m/z* of 7371, which

**Table 1.** Patient characteristics.

Characteristics	Unfavorable group (n = 10)	Favorable group (n = 10)
Gender (male/female), n	7/3	7/3
Age (years); median (range)	63.6 (48–80)	58.6 (45–76)
Node positive in primary tumor (n)	10	0
Disease-free interval <12 months (n)	10	0
Carcinoembryonic antigen <200 ng/ml (n)	4	10
Number of tumors; median (range)	4.6 (1–10)	1
Multinodularity (n)	9	0
Tumor size (cm); median (range)	8.2 (5–13.5)	3.1 (1.1–5.6)
Largest tumor >5 cm (n)	9	1

Table 2. Summary of extremely statistically significant protein peaks detected between colorectal liver metastases patients and healthy subjects.

<i>m/z</i> (Da)	Intensity ( $\mu$ A), mean $\pm$ standard deviation		p-value
	Healthy subjects	Metastatic patients	
2462	9.2 $\pm$ 1.6	2.0 $\pm$ 0.6	<0.0001
3467	86.4 $\pm$ 8.7	18.4 $\pm$ 5.2	<0.0001
5325	5.5 $\pm$ 0.5	16.9 $\pm$ 1.8	<0.0001
7371	41.3 $\pm$ 6.5	4.3 $\pm$ 2.2	<0.0001
10,321	7.6 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.3	<0.0001

was almost suppressed in metastatic patients when compared with healthy subjects (Figure 1). Specifically, the peak intensity of the *m/z* 7371 ranged between 20.4 and 84.7  $\mu$ A in the healthy control group. Only one out of the ten patients with CRLM expressed the peak intensity at *m/z* 7371 within the same range of the control group. Using receiver-operating curves analysis, we set the cutoff value of the *m/z* 7371 protein peak at 12.4  $\mu$ A, which gave a sensitivity of 94.1%, a specificity of 100%, a predictive positive value of 100% and a predictive negative value of 90.9%.

#### • Prognostic role of proteomic profiles in patients with CRLM

Only four of the 72 protein peaks detected using the CM10 ProteinChip arrays showed significant differences between favorable and unfavorable CRLM groups (Table 3). However, none of them were able to clearly differentiate both groups individually. Thus, we decided to generate a CART based on all the 72 detected protein peaks to predict the prognosis by differentiating favorable and unfavorable patients. In this direction, the peaks that best differentiated favorable and unfavorable groups were the combination of *m/z* 2970 and 2871 with intensity cutoffs of 7.6 and 187  $\mu$ A, respectively (Figure 2). This CART analysis gave a sensitivity of 100%, a specificity of 90%, a predictive positive value of 88.9% and a predictive negative value of 100%.

#### Discussion

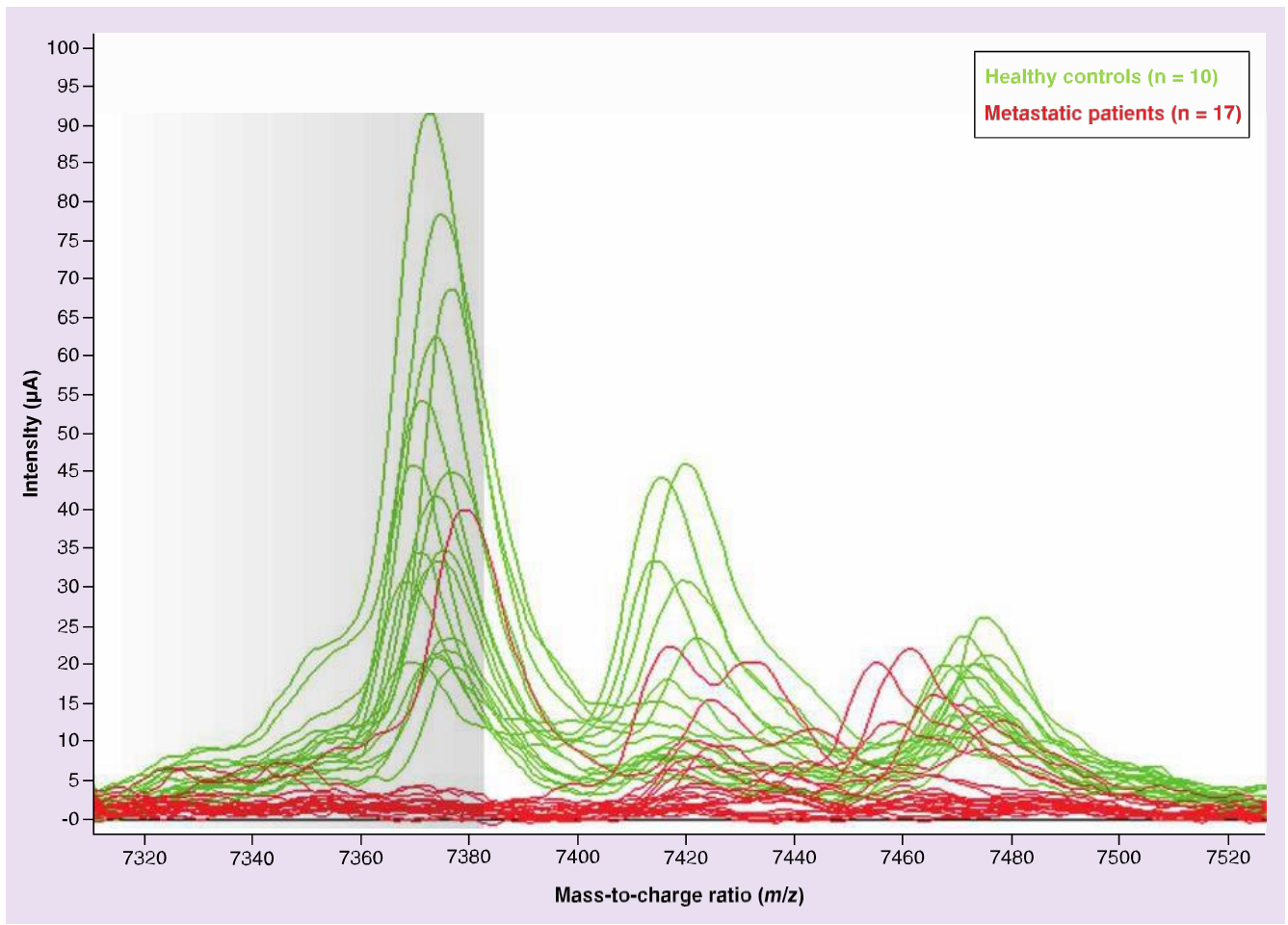
The application of proteomic technology to the field of oncology (oncoproteomics) has enabled the discovery of neoplastic biomarkers that can improve early diagnosis, reveal new therapeutic targets and help with the choice of the best treatment [11,12]. Oncoproteomics measures quantitatively the proteins in tissue or fluid and studies the changes in these proteomic profiles

within different stages of the neoplastic disease [12,21–25]. In the case of colorectal cancer, there are many recent studies that refer to possible serum markers as prognostic factors but very few have specifically focused at the CRLM level [13–18].

Nowadays, the diagnosis of colorectal cancer and its metastatic spread completely relies on radiologic and endoscopic methods because there is no biochemical parameter that can appropriately diagnose this disease at an early stage. Several compounds have been proposed for colorectal cancer screening, with carcinoembryonic antigen being the most used because of its usefulness as follow-up biomarker, but the lack of sensitivity and specificity has limited their general acceptance [10]. In our study, the different proteomic profiles in liver tissue obtained from healthy controls and from CRLM patients were significantly different and it was possible to discern CRLM patients from the control group through a protein peak (7380 *m/z*) that was almost completely suppressed in CRLM patients. These findings of good screening sensitivity and specificity with the need to use only one protein peak show that proteomic profiling of liver tissue can be a promising tool for CRLM screening and that this positive potential deserves further studies to confirm and refine its full screening value. It is possible to formulate several hypotheses to explain the protein peak differences, the most intuitive and attractive being that the presence, substitution or inhibition of one or more proteins is responsible for the profile differences. However, it has to be kept in mind that within several hypotheses, the differences in protein peaks may still be just caused by the simple presence of colonic epithelial characteristics and not by neoplastic features, a fact that the design of subsequent studies (with more and different types of patients) definitively have to take into account.

Clinical prognostic scores have been classically used to estimate the prognosis of patients after CRLM resection but their accuracy of risk assessment is limited because they do not include the effects of the latest medical developments on prognosis [8]. Some authors have attempted to increase their prediction power adding some clinical characteristics or biochemical parameters, but the results have not been universally accepted [8,26]. In this direction, the development of new techniques like proteomics has given the possibility to find new proteins implicated in pathophysiological mechanisms that would influence CRLM progression and thus determine the prognosis in these patients. In our study, we found that the CART algorithm tree using  $m/z$  2970 and 2871 peaks accurately classified CRLM patients with favorable and unfavorable prognosis according to Fong's clinical risk score. Also, bearing in mind that samples of both

groups were identically obtained, treated and analyzed, we concluded that the peptides that are differentially expressed between the favorable and unfavorable CRLM patients are not resulted from any artificial enzymatic digestion. Although some controversy has recently arisen from the fact that Fong's score may not always accurately predict the actual patient survival despite being the most validated clinical score for CRLM patients [8], we believe that our results still show the value of proteomic profiling of liver tissue to predict the prognosis in CRLM, something that could be potentially used to guide the treatment selection in these patients. For these reasons, we acknowledge that still more and varied patients with actual survival information and other survival scores are needed to validate our study in terms of prognosis prediction and thus ascertain the complete prognostic value of proteomic profiling, we believe that our results are truly



**Figure 1. Differential proteomic profile between healthy controls (green) and colorectal liver metastases patients (red).**





**PRELIMINARY COMMUNICATION** Reyes, Marti, Marfa *et al.*

**Table 3. Summary of statistically significant protein peaks detected between colorectal liver metastases patients with favorable and unfavorable outcome.**

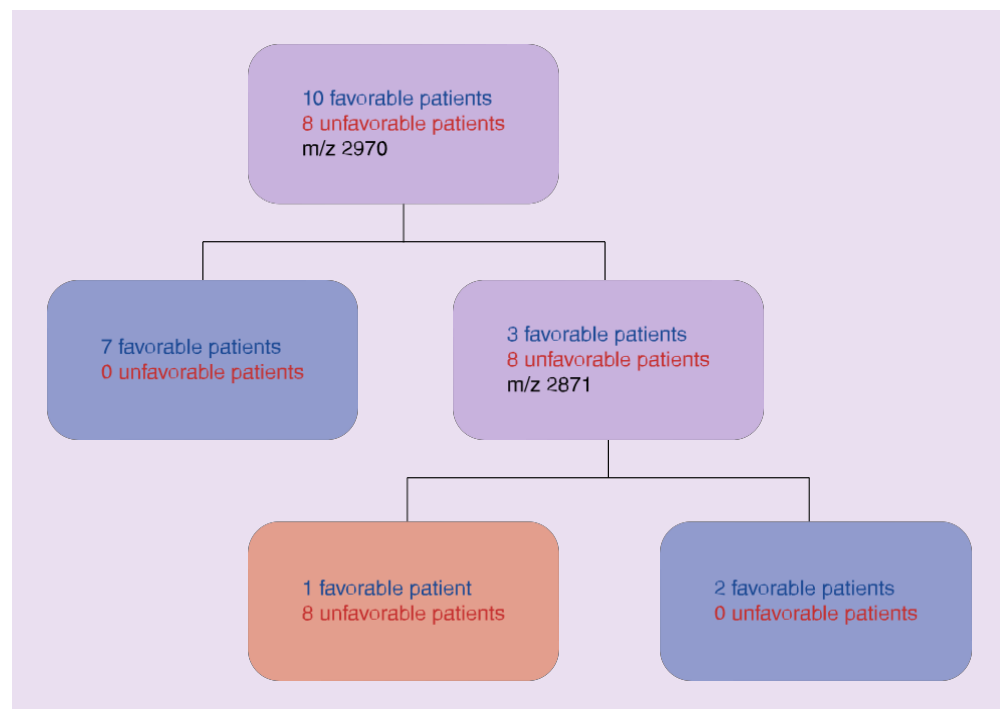
<i>m/z</i> (Da)	Intensity ( $\mu$ A), mean $\pm$ standard deviation		p-value
	<i>Favorable</i>	<i>Unfavorable</i>	
3446	74.5 $\pm$ 25.6	20.1 $\pm$ 6.5	0.03
3487	54.1 $\pm$ 15.4	17.5 $\pm$ 6.0	0.05
4231	7.0 $\pm$ 1.3	15.3 $\pm$ 2.5	0.02
10,222	3.4 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 1.6	0.02

encouraging and set the grounds for more specific future studies that should follow this present study.

One of the desired characteristics of any screening or prognostic tool is simplicity, a fact that has both clinical and economic implications [10]. Our study showed that an appropriate CART algorithm with only two protein peaks can render good classification results in terms of discerning the absence or presence of neoplastic activity and also in terms of predicting the clinical behavior after CRLM resection. These two features make proteomics a very attractive technique from the clinical point of view and at first sight it would be also interesting to know the specific protein expression that leads to the peak because of the implied possibility to

regulate its function. However, direct protein identification with SELDI-TOF-MS technology is usually a time-consuming and complicated procedure [27] that can potentially include artifacts in the proteomic profiles and for these reasons in this study we only focused on the overall proteomic profiling and their clinical utility because of its preliminary nature.

Our study is the first to successfully identify specific proteomic profiles in liver tissue that can help to both differentiate healthy subjects from CRLM patients and classify the severity of CRLM patients. However, despite these promising results, the preliminary design makes that this study still needs to be followed by confirmatory studies that should include more and different patients (allowing comparison of



**Figure 2. Decision tree model for the classification of liver tissue samples from patients with favorable and unfavorable prognosis generated by classification and regression tree analysis.**

## Prognostic prediction by liver proteomic profiling **PRELIMINARY COMMUNICATION**

normal colonic cells, primary colorectal cells, CRLM cells and nonmalignant liver cells adjacent to CRLM) and specially aim for identification and subsequent validation of specific markers. Also, concerning the differentiation between better and worse prognosis in CRLM patients, the inclusion and stratification by several known prognostic factors of the tumor that are not part of the Fong's score in subsequent studies would provide additional independent prognostic information. Moreover, although liver samples are the most specific way to diagnose CRLM, they are not the ideal samples to predict patients' prognosis because they require invasive obtaining techniques. A possible solution to this limitation would be to test the correspondence between intracellular proteomic profiles and the simultaneous proteomic profiles in more easily accessible samples like blood or bile. For all these reasons, we believe that future studies should also explore the correlations between proteomic profiling in liver samples and more accessible samples to help decrease the invasiveness of diagnostic sampling while keeping a good diagnostic accuracy.

To conclude, it is expected that in the future, new biological technologies will increase in sensibility to detect substances derived from tumors and other diseases. Thus, the prognosis prediction of patients with CRLM will not be anymore relying in clinical characteristics but on biological parameters that will have enough prognostic diagnostic power to guide our decisions regarding complementary treatments and specific follow-up. In this direction, our study shows that proteomic profiling in liver samples is a promising technique to differentiate

healthy subjects from CRLM patients and to classify the outcome of CRLM patients although further studies on larger and different patients' populations are needed to confirm and validate our preliminary findings.

### Disclosure

*This study was presented as an oral communication at the 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (9–13 November 2012, Boston, MA, USA).*

### Financial & competing interests disclosure

*This work was supported by grants from Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF 2012–35979 to W Jiménez and BES-2010–035452 to S Marfà) and from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (SGR 2009/1496). CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III. This work is cofinanced by the EU through the European Regional Development Fund (ERDF) 'A way of making Europe'. The Association 'Llavaneres contra el Càncer' supported the work of J Fuster. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.*

*No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.*

### Ethical conduct of research

*The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.*

## EXECUTIVE SUMMARY

- New biological technologies enable to detect substances derived from tumors with increased sensibility.
- Although their accuracy has been limited with the use of new medical and surgical advances, the prognosis for patients with colorectal liver metastases (CRLM) is currently best estimated using risk scores that rely on clinical characteristics.
- Proteomic profiling from liver samples differentiates healthy subjects from CRLM patients with good sensibility and specificity.
- Proteomic profiling from liver samples can classify the prognosis of CRLM patients with acceptable sensibility and specificity.
- Although further confirmatory studies and validation are still needed, proteomic profiling from liver samples can become helpful to improve early diagnosis, reveal new therapeutic targets and help choosing of the best treatment.

## PRELIMINARY COMMUNICATION Reyes, Marti, Marfa *et al.*

### References

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2015. *CA Cancer J. Clin.* 65(1), 5–29 (2015).
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ *et al.* Colorectal cancer. *Lancet* 375(9719), 1030–1047 (2010).
- Meriggi F, Bertocchi P, Zaniboni A. Management of potentially resectable colorectal cancer liver metastases. *World J. Gastrointest. Surg.* 5(5), 138–145 (2013).
- Mentha G, Terraz S, Andres A, Toso C, Rubbia-Brandt L, Majno P. Operative management of colorectal liver metastases. *Semin. Liver Dis.* 33, 262–272 (2013).
- Juez I, Rubio C, Figueras J. Multidisciplinary approach of colorectal liver metastases. *Clin. Transl. Oncol.* 13(10), 721–727 (2011).
- Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann. Surg.* 230, 309–318 (1999).
- Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC *et al.* Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Française de Chirurgie. *Cancer* 77, 1254–1262 (1996).
- Schreckenbach T, Malkomes P, Bechstein WO, Woeste G, Schnitzbauer AA, Ulrich F. The clinical relevance of the Fong and the Nordlinger scores in the era of effective neoadjuvant chemotherapy for colorectal liver metastasis. *Surg. Today* 45(12), 1527–1534 (2015).
- Kargozaran H, Kehlenberg M, Khatri VP. The implications of colorectal cancer molecular biology in clinical practice. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 17(2), 341–355 (2008).
- Tejpar S. The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastr.* 21(6), 1071–1087 (2007).
- Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5(10), 588–599 (2008).
- Guo Y, Fu Z, Van Eyk JE. A proteomic primer for the clinician. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 9–17 (2007).
- Ying-Tao Z, Yi-Ping G, Lu-Sheng S, Yi-Li W. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between metastatic and non-metastatic human colorectal carcinoma cell lines. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 17(7), 725–732 (2005).
- Li SY, An P, Cai HY *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins involving in liver metastasis of human colorectal carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 9(2), 149–153 (2010).
- Zhang Lq, Guan X, Zhou Jn *et al.* Comparative proteomic analysis identifies proteins associated with colorectal cancer hepatic metastasis. *Int. J. Colorectal Dis.* 27(8), 1119–1120 (2012).
- Turtoi A, Blomme A, Debois D *et al.* Organized proteomic heterogeneity in colorectal cancer liver metastases and implications for therapies. *Hepatology* 59(3), 924–934 (2014).
- Zhu D, Zhong Y, Wu H *et al.* Predicting metachronous liver metastasis from colorectal cancer using serum proteomic fingerprinting. *J. Surg. Res.* 184(2), 861–866 (2013).
- Marti J, Fuster J, Estanyol JM *et al.* Clinical and prognostic usefulness of serum proteomic profile in hepatic colorectal metastases: a pilot prospective study. *Clin. Transl. Oncol.* 15(9), 691–697 (2013).
- Martí J, Modolo MM, Fuster J *et al.* Prognostic factors and time-related changes influence results of colorectal liver metastases surgical treatment: a single-center analysis. *World J. Gastroenterol.* 15(21), 2587–2594 (2009).
- Marfa S, Crespo G, Reichenbach V *et al.* Lack of a 5.9 kDa peptide C-terminal fragment of fibrinogen  $\alpha$  chain precedes fibrosis progression in patients with liver disease. *PLoS ONE* 9(10), e109254 (2014).
- Gonzalez-Gonzalez M, Garcia JG, Montero JA *et al.* Genomics and proteomics approaches for biomarker discovery in sporadic colorectal cancer with metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 10(1), 19–25 (2013).
- Ciordia S, de Los Ríos V, Albar JP. Contributions of advanced proteomics technologies to cancer diagnosis. *Clin. Transl. Oncol.* 8(8), 566–580 (2006).
- Spigel F, Roa JC. Surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI): tecnología proteómica y su aplicación en oncología. *Med. Clin. (Barc.)* 131(8), 312–317 (2008).
- Gemoll T, Roblick UJ, Auer G, Jörnvall H, Habermann JK. SELDI-TOF serum proteomics and colorectal cancer: a current overview. *Arch. Physiol. Biochem.* 116(4–5), 188–196 (2010).
- O'Dwyer D, Ralton LD, O'Shea A, Murray GI. The proteomics of colorectal cancer: identification of a protein signature associated with prognosis. *PLoS ONE* 6(11), e27718 (2011).
- Spolverato G, Ejaz A, Azad N, Pawlik TM. Surgery for colorectal liver metastases: the evolution of determining prognosis. *World J. Gastrointest. Oncol.* 5(12), 207–221 (2013).
- Kiehntopf M, Siegmund R, Deufel T. Use of SELDI-TOF mass spectrometry for identification of new biomarkers: potential and limitations. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45(11), 1435–1449 (2007).

## 6.2 RESULTADOS DE EL ESTUDIO PARA VALIDACIÓN (Segundo artículo)

### **Metastatic Tissue Proteomic Profiling Predicts 5-Year Outcomes in Patients with Colorectal Liver Metastases.**

Como hemos señalado, el objetivo de este trabajo fue identificar un panel potencial de proteínas en tejido de MHCR con pronóstico grave, con el objetivo de validar si este perfil proteómico identificado podría ser útil como herramienta pronóstica en pacientes con MHCR.

Las muestras se midieron 15 veces en una matriz ProteinChip CM10 (Bio-Rad), y los espectros del SELDI-TOF-MS se analizaron con precisión. En base a los cuatro picos de proteínas más intensos detectados en el rango  $m/z$  1.000-25.000 Da, el coeficiente máximo de variación (CV) dentro del ensayo (spot to spot) 44.70% para intensidad de pico y 0.04% para precisión de masa. Además, también se evaluó la variación día a día. Las muestras de tumor hepático se procesaron y analizaron independientemente en tres días, y el CV máximo para la intensidad máxima y para la precisión de la masa ( $m/z$ ) fue de 39,56% y 0,12% respectivamente.

21 pacientes MHCR graves y 36 pacientes con MHCR leves constituyeron el conjunto de casos estudiados (tabla 1 en art). El mapa proteómico de los pacientes con MHCR leve difería ligeramente del de los pacientes con MHCR grave.

Se detectaron 118 picos de proteína en un rango de 1 a 25 kDa. Entre ellos, sólo las proteínas que muestran una intensidad máxima de al menos  $2 \mu A$  y una desviación estándar de  $m/z$  por debajo de 11 se consideraron para un análisis más detallado. Además, sobre la base de los resultados obtenidos, proteínas con un CV mayor al 30% para la intensidad máxima y/o mayor a un 0,02% para la precisión de masa, también fueron excluidos. En consecuencia, se seleccionaron 39 picos de proteína.

La Figura 1 en nuestra publicación muestra los espectros proteicos obtenidos por SELDI-TOF-MS que oscilaron entre  $m/z$  2.000 y  $m/z$  11.000 en los casos estudiados. Se detectaron varias diferencias de

proteínas en el perfil proteómico del tumor hepático entre los dos grupos. En particular, tres picos de proteína con valores  $m/z$  de 2.726, 3.251 y 9.950, y mostrados como A, B y C, respectivamente, fueron los más estadísticamente significativos. La intensidad de los picos de proteína  $m/z$  2,726 y  $m/z$  3,251 se redujo en pacientes leves comparados con los de MHCR graves.

Por otro lado, el pico de la proteína  $m/z$  9,950 se reguló en el grupo de leve (tabla 2 del art). Sin embargo, ningún pico de proteína única fue capaz de discriminar claramente entre los pacientes de MHCR leve y grave.

Evaluación del análisis CART en el grupo de casos incluidos en el estudio de validación: El análisis CART permite la detección de pacientes MHCR graves: Para medir el impacto de todos los picos de proteína detectados e identificar aquellos con mayor poder discriminatorio, se utilizó un procedimiento no paramétrico basado en los datos normalizados obtenidos por SELDI-TOF-MS. Se generó un análisis CART con 5 nodos terminales y se consideró que la combinación de cuatro picos de proteínas diferentes era la más relevante para construir el algoritmo de diagnóstico (figura 2A en el art). Los picos de proteína que mejor diferenciaron a los pacientes con MHCR leves de los pacientes con MHCR graves fueron  $m/z$  2,726,  $m/z$  2,761,  $m/z$  3,110 y  $m/z$  4,939. La Figura 2B muestra los espectros proteómicos de estos picos. El árbol de clasificación arrojó una sensibilidad del 85,7%, una especificidad de 86,1% y un valor predictivo negativo (VPN) y un valor predictivo positivo (VPP) de 91,2% y 78,3%, respectivamente. Para probar aún más la precisión diagnóstica del árbol de clasificación en pacientes con MHCR, se construyó una curva ROC. La Figura 3 del art muestra la excelente precisión diagnóstica del árbol de clasificación para diferenciar a los pacientes de MHCR leves de graves (AUROC: 0,903).

La validación de CART predice los resultados en los pacientes MHCR graves: Para confirmar que el árbol de clasificación podría ser utilizado como una herramienta pronóstica, un grupo independiente de 28 pacientes MHCR fue probado como el conjunto de validación ciega. Todas las muestras tumorales hepáticas se recogieron y procesaron como se describe en el grupo de entrenamiento. Como se observó en los espectros MS, se

observaron patrones muy similares en el grupo de validación en comparación con el conjunto de entrenamiento (figura 4 del art). En particular, los cuatro picos de proteína utilizados para construir el árbol de clasificación mostraron una precisión de masa extremadamente alta. El máximo  $m/z$  error se detectó en el pico de proteína de 3,1 da, a pesar de la precisión de masa. Después de realizar el análisis CART, 15 pacientes MHCR se agruparon como "leves", mientras que 13 fueron considerados "graves". Posteriormente, los datos proteómicos se compararon con el resultado clínico de cada paciente. Las principales características demográficas de los pacientes incluidos en el conjunto de validación se muestran en la tabla 1. Sólo dos pacientes leves fueron clasificados erróneamente, mientras que esta cifra fue de 5 en el grupo de pacientes con MHCR graves. Estos resultados ofrecieron una sensibilidad y especificidad de 68,8% y 83,3%, respectivamente. Finalmente, también se determinaron el VAN, así como el PPV y la tasa de descubrimiento falso ( $FDR = 1 - PPV$ ) (figura 4 del art). Las cifras fueron del 66,7%, 84,6% y 15,4%, respectivamente.



## Metastatic Tissue Proteomic Profiling Predicts 5-Year Outcomes in Patients with Colorectal Liver Metastases<sup>1</sup>



Santiago Marfà<sup>\*</sup>, Josep Martí<sup>†</sup>, Adalgiza Reyes<sup>†</sup>, Gregori Casals<sup>\*</sup>, Guillermo Fernández-Varo<sup>\*,‡</sup>, Silvia Carvajal<sup>\*</sup>, J.C. García-Valdecasas<sup>†</sup>, Josep Fuster<sup>†</sup> and Wladimiro Jiménez<sup>\*,‡</sup>

<sup>\*</sup>Biochemistry and Molecular Genetics Service, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; <sup>†</sup>HepatoBilioPancreatic Surgery and Transplant Unit Department of Surgery, ICMDM, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>‡</sup>Department of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

### Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in the developed countries, and nearly 70% of patients with CRC develop colorectal liver metastases (CRLMs). During the last decades, several scores have been proposed to predict recurrence after CRLM resection. However, these risk scoring systems do not accurately reflect the prognosis of these patients. Therefore, this investigation was designed to identify a proteomic profile in human hepatic tumor samples to classify patients with CRLM as “mild” or “severe” based on the 5-year survival. The study was performed on 85 CRLM tumor samples. Firstly, to evaluate any distinct tumor proteomic signatures between mild and severe CRLM patients, a training group of 57 CRLM tumor samples was characterized by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, and a classification and regression tree (CART) analysis was subsequently performed. Finally, 28 CRLM tumor samples were used to confirm and validate the results obtained. Based on all the protein peaks detected in the training group, the CART analysis was generated, and four peaks were considered to be the most relevant to construct a diagnostic algorithm. Indeed, the multivariate model yielded a sensitivity of 85.7% and a specificity of 86.1%, respectively. In addition, the receiver operating characteristic (ROC) curve showed an excellent diagnostic accuracy to discriminate mild from severe CRLM patients (area under the ROC: 0.903). Finally, the validation process yielded a sensitivity and specificity of 68.8% and 83.3%, respectively. We identified a proteomic profile potentially useful to determine the prognosis of CRLM patients based on the 5-year survival.

*Translational Oncology (2016) 9, 445–452*

Address all correspondence to: Dr. Wladimiro Jiménez, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic Universitari, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain.

E-mail: [wjimenez@clinic.ub.es](mailto:wjimenez@clinic.ub.es)

<sup>1</sup> Funding: This work has been supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 2012-35979 and SAF 2015-64126-R to W. Jiménez and BES-2010-035452 to S. Marfà) and from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (SGR 2009/1496 and SGR 2014/219). This work has also been cofinanced

by the European Union through the European Regional Development Fund, “A way of making Europe.” CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III. Received 20 June 2016; Revised 3 August 2016; Accepted 8 August 2016

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Neoplasia Press, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). 1936-5233/16

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2016.08.002>



## Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the United States in terms of incidence and mortality [1], and similar results are also observed in other developed countries [2]. Nearly 70% of patients with CRC develop colorectal liver metastases (CRLMs), and 10% to 25% are diagnosed at the time of resection of the primary tumor [3,4]. At present, surgical resection still remains the most effective procedure to lengthen patient survival and is the only curative treatment [5,6], with a 5-year survival rate of CRLM after hepatic resection ranging from 30% to 60% [7]. Although some patients are not surgical candidates, recent advances in chemotherapy, radiofrequency ablation, and thermoablative methods have increased the number of patients eligible for surgical resection [8]. Several scores to predict recurrence after CRLM resection have been proposed to improve the diagnosis and prognosis of these patients [9–12], with the Fong score being one of the most known tools used for this purpose. However, current risk scoring systems do not accurately reflect the prognosis, and patient survival can be very similar even with very different score values [13]. Thus, identification of a more accurate system to predict patient survival is still of major relevance. In this regard, the use of biomarkers that could, independently or associated with classical prognostic indices, predict the neoplastic evolution of the patient after surgical CRLM resection is a well-defined strategy to enhance the reliability of predicting the prognosis of CRLM [14,15]. Furthermore, biomarkers could improve the selection of the optimal treatment for each patient to enhance their prognosis.

In the current investigation, high-throughput proteomic techniques were used to identify a potential protein panel in human hepatic tumor samples to detect CRLM patients with a poor prognosis. Ultimately, we aimed to validate whether the protein panel profile identified could be useful as a prognostic tool in CRLM patients.

## Patients and Methods

### *Patients and Routine Laboratory Tests*

Patients admitted to the Liver Transplantation Unit to undergo CRLM resection from April 2005 to March 2012 were prospectively considered for this study and were followed according to institutional guidelines [16]. We obtained all clinical and pathological data from the Liver Surgery Unit prospective database and clinical charts and selected only the patients who could be included in a specific prognostic group according to survival time. Thus, a total of 85 CRLMs were studied. Exclusion criteria were previous CRLM resection or refusal to participate in the study. Chemotherapy regimens used before hepatic resections were based on 5-fluorouracil alone or associated with irinotecan or oxaliplatin according to local protocols. Patients were classified based on their long-term outcome. Thus, patients were considered as “mild” if their survival time was longer than 5 years or “severe” if it was lower. Venous blood samples from all CRLM patients were obtained after fasting. Extracted serum samples were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and several serum parameters, including alanine transaminase, aspartate aminotransferase, albumin, bilirubin, or creatinine, among others, were measured with the ADVIA 2400 Instrument (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY). CEA serum levels were determined using the ADVIA Centaur XP Immunoassay System (Siemens Healthcare Diagnostics).

The design of the study was two-fold. Firstly, in a training set of 57 CRLM patients, we assessed whether the tissue proteomic profile of

the mild patients differed from that of severe patients. Routine liver and renal function tests were also analyzed in these patients. Thereafter, liver tissue samples from 28 CRLM patients were also collected and included in the blinded validation group to confirm the results obtained.

### *Liver Resection of Metastatic Colorectal Cancer and Specimen Collection*

All metastatic tissue samples from patients undergoing curative resection of CRLM were collected and immediately cryopreserved in liquid nitrogen and kept until further analysis.

### *Hepatic Protein Extraction and Protein Fractionation from Liver Homogenates*

Approximately 50 mg of tumor hepatic tissue was ground to fine powder in dry ice and solubilized by pestle homogenization in 500  $\mu\text{l}$  of urea buffer (9.5 M urea, 2% CHAPS, 1% DTT, 50 mM Tris-HCl, pH). Thereafter, tissue homogenates were incubated in a rotating mixer for 1 hour at  $4^{\circ}\text{C}$ , and insoluble material was removed by centrifugation (16,000  $\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes). Afterwards, samples were aliquoted and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until protein fractionation was performed. In short, samples were fractionated by pH using a 96-well filtration plate (Pall Corp., Port Washington, NY) with 200  $\mu\text{l}$  of a macro-prep high Q anion exchange support (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in each well. Flow-through was discarded by vacuum filtration. Subsequently, each well was washed twice with 200  $\mu\text{l}$  of distilled water and equilibrated with 200  $\mu\text{l}$  of rehydration buffer (50 mM Tris-HCl, pH). Wells were incubated for 1 hour at room temperature. Thereafter, each well was equilibrated three times with 200  $\mu\text{l}$  of an equilibration buffer [1 M urea, 0.2% (w/v) CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH]. Prior to fractionation, 20  $\mu\text{l}$  of tissue homogenates was mixed with 30  $\mu\text{l}$  of urea buffer [9 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH] in a 96-well V-bottom plate for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  in a horizontal orbital microplate shaker. Samples were then diluted with 50  $\mu\text{l}$  of equilibration buffer, transferred to each well, and incubated for 30 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  with shaking. All samples were eluted in a stepwise manner by altering the pH of the wash buffer. Six different fractions were obtained. Flow-through was collected by vacuum filtration into V-bottom microplates, and all were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until proteomic analysis.

### *Proteomic Processing of Hepatic Tissue Samples*

Protein profiling was analyzed by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) using the eight-spot format ProteinChip array (Bio-Rad). In a preliminary study to optimize the experimental conditions, two pooled samples from mild CRLM patients and severe CRLM patients were fractionated, and the six fractions obtained were loaded onto three different types of ProteinChip arrays that had different protein binding affinity; weak cation exchange arrays (CM10), immobilized metal affinity chromatography arrays (IMAC30), and hydrophobic/reverse-phase arrays (H50). The resulting protein profile from each pool was compared, and the fraction number 3 using the CM10 ProteinChip array showed the highest number of peaks detected, the highest total signal intensity, and the major differences between groups when compared with all other fractions and ProteinChip arrays. Thus, fraction number 3 and CM10 ProteinChip array were selected for the subsequent studies. Prior to sample loading, spots were equilibrated twice with 200  $\mu\text{l}$  of a sodium acetate buffer (0.1 M

sodium acetate, pH). Meanwhile, 40  $\mu$ l of the fractionated sample was mixed with 60  $\mu$ l of the sodium acetate buffer, and this mixture (100  $\mu$ l) was subsequently loaded randomly and incubated for 1 hour on a shaker at room temperature. Afterward, CM10 ProteinChip arrays were washed three times with 200  $\mu$ l of the sodium acetate buffer for 5 minutes on a shaker at room temperature and twice with deionized water to remove unbound proteins. Thereafter, arrays were air-dried, and 1  $\mu$ l of energy-absorbing matrix (saturated sinapinic acid in an aqueous solution containing 50% acetonitrile and 0.5% trifluoroacetic acid) was added twice to each spot. The surface was allowed to air dry between each application. Finally, ProteinChips were read in the ProteinChip PBS II reader (Bio-Rad).

### Data Acquisition and Analysis

All data were processed as described elsewhere [17]. Briefly, each spot was analyzed at three different energy laser intensities: 2500 nJ, 3000 nJ, and 3500 nJ, and the mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) was set from  $m/z$  1000 to 25,000 for the low-energy laser intensity, between  $m/z$  2500 and 200,000 for the medium-energy laser intensity, and from  $m/z$  5000 to 200,000 for the high-energy laser intensity. In addition, peak resolution was focused at  $m/z$  5000, 12,000, or 19,000 according to low-, medium-, or high-energy laser intensity, respectively.

Protein spectra were calibrated using two different external calibration standards (all-in-one peptide standard and all-in-one protein standard, Bio-Rad Laboratories), and they were subsequently normalized by the average total ion current across the group. To minimize outliers, all spectra differing by at least twice the standard deviation from the mean were deleted. Baseline adjustments, peak selection parameters such as the minimal signal-to-noise ratio, valley depth, and  $m/z$  error were also defined as described previously [17]. Afterward, all protein peak clusters automatically identified were manually verified. Relabeling, removal, or addition of peaks was performed when necessary.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by the nonparametric Mann-Whitney  $U$  test or the Fisher test when appropriate. Results are expressed as mean  $\pm$  SE, and  $P$  values lower than .05 were considered significant. All statistical clinical analyses were performed with the PASW Statistical Package Version 18.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL). Quantitative proteomic data were analyzed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Finally, a classification and regression tree (CART) analysis was performed using the Biomarker Patterns (Bio-Rad) to detect the protein peaks with the greatest contribution to discriminate both groups.

### Ethical Approval

We obtained written informed consent from all patients included in the study when they were proposed for surgery, and the investigation was approved by the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona following the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

### Results

The main demographic variables of the patients included in the training set are summarized in Table 1. Of note is that nearly 40% of the CRLM patients included in the training group showed

**Table 1.** Patient Characteristics and Differences between Training and Validation Groups

	Overall Group ( $n = 85$ )	Training Group ( $n = 57$ )	Validation Group ( $n = 28$ )	$P$ Value
Gender (M/F)	65/20	43/14	22/6	NS
Age (years)	65.0 $\pm$ 0.9	65.2 $\pm$ 1.1	64.6 $\pm$ 1.8	NS
Node positive in primary tumor [ $n$ (%)]	58 (68.2%)	41 (71.9%)	17 (60.7%)	NS
Disease-free interval <12 months [ $n$ (%)]	58 (68.2%)	43 (75.4%)	15 (53.6%)	NS
CEA (ng/ml)	34.2 $\pm$ 8.3	43.4 $\pm$ 12.2	15.8 $\pm$ 3.8	<.05
CEA <200 ng/ml	84 (94.1%)	52 (91.2%)	28 (100%)	NS
Number of tumors	2.7 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.6	NS
Multinodularity [ $n$ (%)]	56 (65.9%)	38 (66.7%)	18 (64.3%)	NS
Tumor size (cm)	3.0 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.6	<.05
Largest tumor >5 cm [ $n$ (%)]	10 (11.8%)	5 (8.8%)	5 (17.9%)	NS
Fong score	2.2 $\pm$ 0.9	2.3 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.2	NS
Fong score $\leq$ 2 (low risk)	51	32	19	–
Fong score >3 (high risk)	34	25	9	–

NS, not significant.

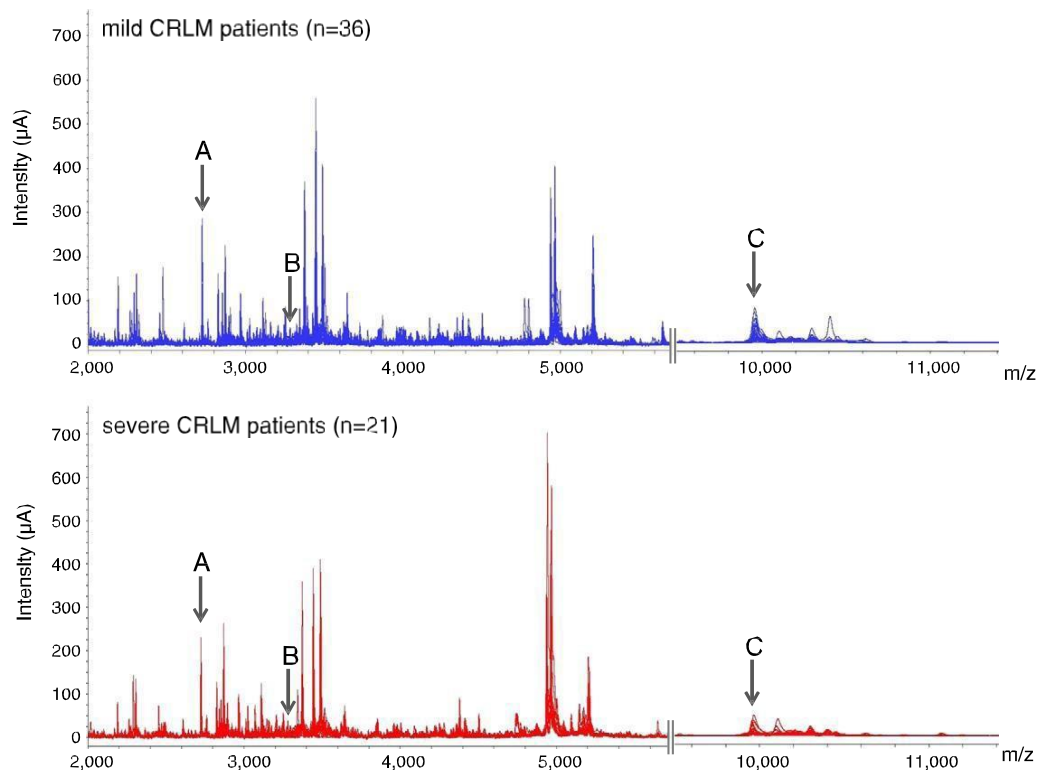
discrepancies between their theoretical risk factor, obtained by Fong's prognostic scoring system, and their actual survival.

### Reproducibility of SELDI-TOF-MS Protein Profiling in Hepatic Tumor Samples

Experiments combining hepatic protein extraction and protein fractionation were performed to evaluate intraexperiment variation. A pooled hepatic tumor sample from the 27 CRLM patients included in the training group was obtained and treated as the other samples. Basically, it was processed independently 15 times and subsequently measured in a CM ProteinChip array (Bio-Rad). Finally, the SELDI-TOF-MS spectra were accurately analyzed. Based on the protein peaks detected in the  $m/z$  1000 to 25,000 range, the intraassay (spot to spot) maximum coefficient of variation (CV) was 44.70% for peak intensity and 0.04% for mass accuracy. In addition, the day-to-day variation was also evaluated. The pooled hepatic tumor sample was processed and analyzed independently in three different days, and the maximum CV for peak intensity and mass accuracy was 39.56% and 0.12%, respectively.

### Differential Proteomic Profiles Between Mild CRLM Patients and Severe CRLM Patients

Twenty-one severe CRLM patients and 36 mild CRLM patients constituted the training set (Table 1). Two technical replicates were analyzed for each sample. We detected 118 protein peaks over a range of 1 to 25 kDa. Among these, only proteins showing a peak intensity of at least 2  $\mu$ A and a  $m/z$  standard deviation below 11 were considered for further analysis. Moreover, and based on the results obtained in the pooled hepatic tumor sample, proteins with a CV greater than 30% for peak intensity and 0.02% for mass accuracy were also excluded. According to this protein peak exclusion strategy, 39 protein peaks were selected (see supplementary data 1). Figure 1 shows the protein spectra obtained by SELDI-TOF-MS which ranged between  $m/z$  2000 and 11,000 in these subjects. Several protein differences were detected in the hepatic tumor proteomic profile between the two groups. In particular, three protein peaks with  $m/z$  values of 2726, 3251, and 9950 and shown in the Figure 1 as A, B, and C, respectively, were the most statistically significant. The intensity of the  $m/z$  2726 and  $m/z$  3251 protein peaks was downregulated in mild compared with severe CRLM patients. On the other hand, the  $m/z$  9950 protein peak was upregulated in the mild group (Table 2). However, no single protein peak was able to clearly discriminate between mild and severe CRLM patients.



**Figure 1.** Differential proteomic signature of mild and severe CRLM patients. Two segments of the SELDI-TOF-MS spectra ranging from  $m/z$  2000 to  $m/z$  5500 and from  $m/z$  9500 to  $m/z$  11,000 of all the tumor tissue samples from CRLM patients comprising the training group. The upper figure shows all the overlapped spectra of mild CRLM patients ( $n = 36$ ). The bottom figure shows the spectra of severe CRLM patients ( $n = 21$ ). Arrows show the three protein peaks with statistical significance between groups. Upper letters correspond to the peptide identification peak noted in Table 2.

### Classification of the Severity of CRLM Patients by CART Analysis

To measure the impact of all the protein peaks detected and identify those with the greatest discriminatory power, a nonparametric procedure was used based on the normalized data obtained by SELDI-TOF-MS. A CART with five terminal nodes was generated, and the combination of four different protein peaks was considered as the most relevant to construct the diagnostic algorithm (Figure 2A). The protein peaks which best differentiated mild from severe CRLM patients were  $m/z$  2726,  $m/z$  2761,  $m/z$  3110, and  $m/z$  4939. Figure 2B shows the proteomic spectra of these protein peaks. The classification tree yielded a sensitivity of 85.7%, a specificity of 86.1%, and a negative predictive value (NPV) and a positive

predictive value (PPV) of 91.2% and 78.3%, respectively. To further test the diagnostic accuracy of the classification tree in CRLM patients, a receiver operating characteristic (ROC) curve was constructed. Figure 3 shows the excellent diagnostic accuracy of the classification tree to differentiate mild from severe CRLM patients (area under the ROC: 0.903).

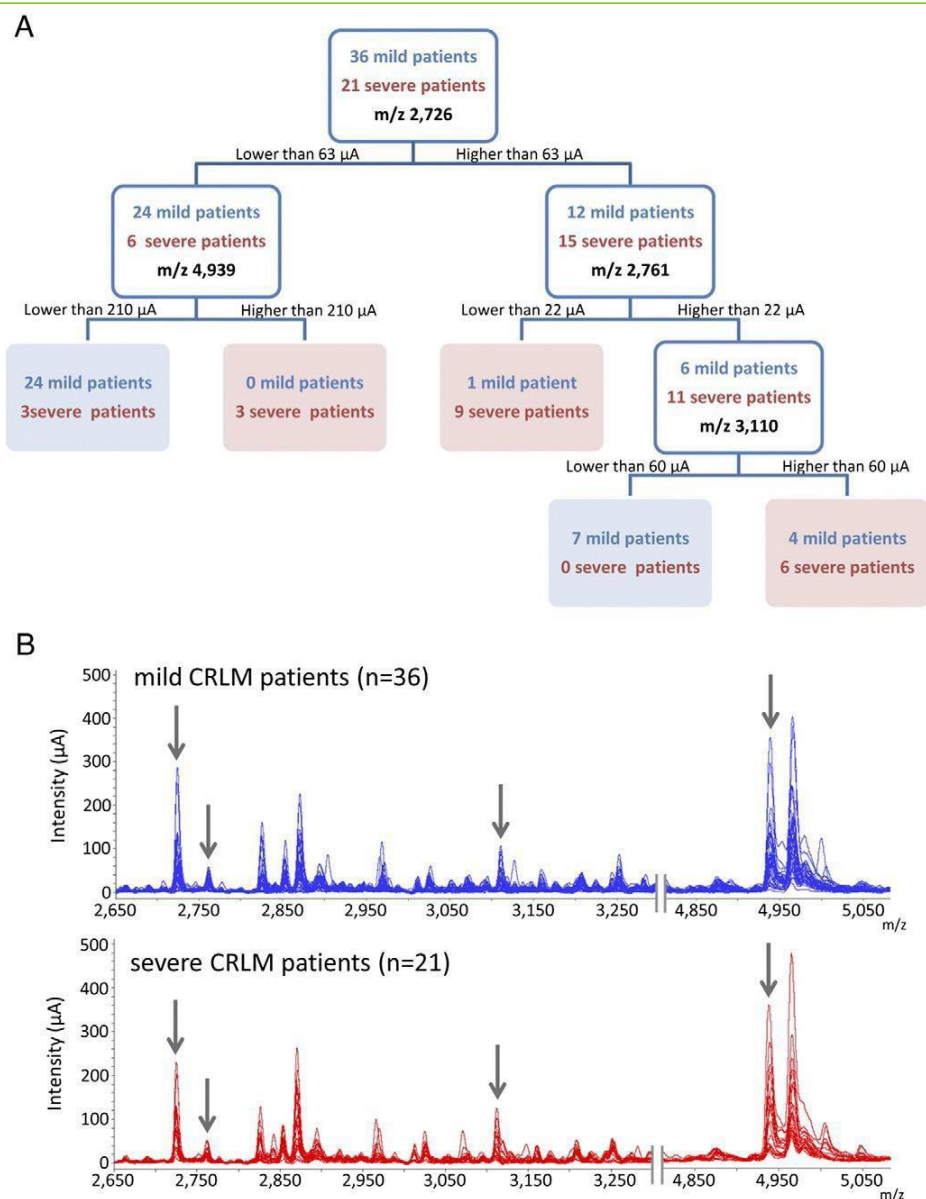
### CART Analysis Assessment in the Validation Group

To confirm that the classification tree could be used as a prognostic tool, an independent group of 28 CRLM patients was tested as the blinded validation set. All hepatic tumor samples were collected and processed as described in the training group. As noticed in the MS spectra, very similar patterns were observed in the validation group when compared with the training set (Figure 4). In particular, the four protein peaks used to construct the classification tree showed an extremely high mass accuracy. The maximum  $m/z$  error was detected in the 3.1-kDa protein peak, despite the mass accuracy being below 505 ppm. After performing the CART analysis, 15 CRLM patients were clustered as “mild,” whereas 13 were considered “severe.” Subsequently, the proteomic data were compared with the clinical outcome of each subject. The principal demographic characteristics of the patients included in the validation set are shown in Table 1. Only two mild patients were misclassified, whereas this figure was five in the group of severe patients. These results yielded a sensitivity

**Table 2.** Main Characteristics of the Protein Peaks Displaying Statistically Different Intensities on Comparing Mild and Severe CRLM Patients

Peptide	$m/z$ (Da)	Intensity ( $\mu$ A)		$P$ Value
		Mild	Severe	
A	2726	59.0 $\pm$ 8.8	87.6 $\pm$ 12.6	.04
B	3251	26.2 $\pm$ 2.9	34.3 $\pm$ 3.3	.03
C	9950	22.7 $\pm$ 3.0	13.8 $\pm$ 2.2	.04

Statistical analysis was performed by Mann-Whitney  $U$  test. Results are given as mean  $\pm$  SE.

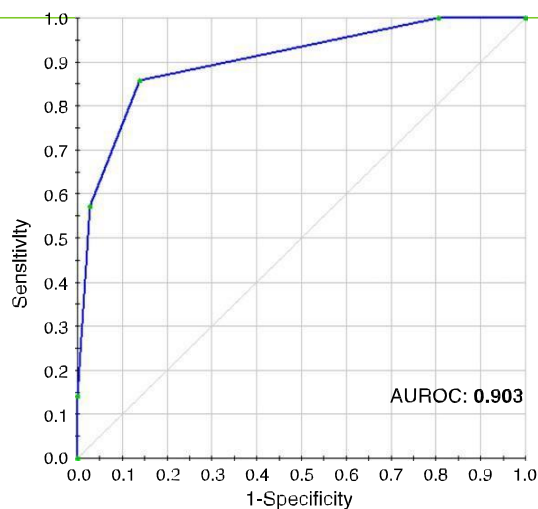


**Figure 2.** CART analysis to classify and differentiate mild from severe CRLM patients based on the proteomic profile obtained from the hepatic tumor samples. (A) Decision tree model for the classification of liver tumor samples from mild and severe CRLM patients. Node 0 (the upper white square of the decision tree) is known as the root node, which indicates the starting point of the decision tree construction and included all the patients. This node is divided based on the intensity value of the  $m/z$  2726. If the intensity is lower than  $63 \mu A$ , then these patients are put in a primary node (left white square) and are subsequently split based on the intensity value of the  $m/z$  4939. However, if the intensity is higher than this cutoff ( $63 \mu A$ ), patients are placed in the right primary node (white square) and further split based on the  $m/z$  2761 protein peak. This procedure is subsequently repeated until a terminal node is reached (blue and red squares). As observed, the majority of mild CRLM patients are clustered in the green terminal nodes, whereas severe CRLM patients are grouped in the red terminal node. Only three severe CRLM patients and five mild CRLM patients were misclassified. (B) Two sections of the SELDI-TOF-MS spectra. The first ranges from  $m/z$  2650 to 3250, and the second is comprised between  $m/z$  4850 and 5050. The upper figure shows all the overlapped spectra of the mild CRLM patients ( $n = 36$ ). The bottom figure shows the spectra of the severe CRLM patients ( $n = 21$ ). Arrows indicate the four protein peaks used to construct the diagnostic algorithm based on the CART analysis.

and specificity of 68.8% and 83.3%, respectively. Finally, the NPV as well as the PPV and the false discovery rate ( $1 - PPV$ ) were also determined (Figure 4). The figures were 66.7%, 84.6%, and 15.4%, respectively.

## Discussion

Early detection of CRLM patients with poor prognosis is fundamental to improve therapeutic interventions and thus increase their life expectancy. At present, the neoplastic prognosis after CRLM

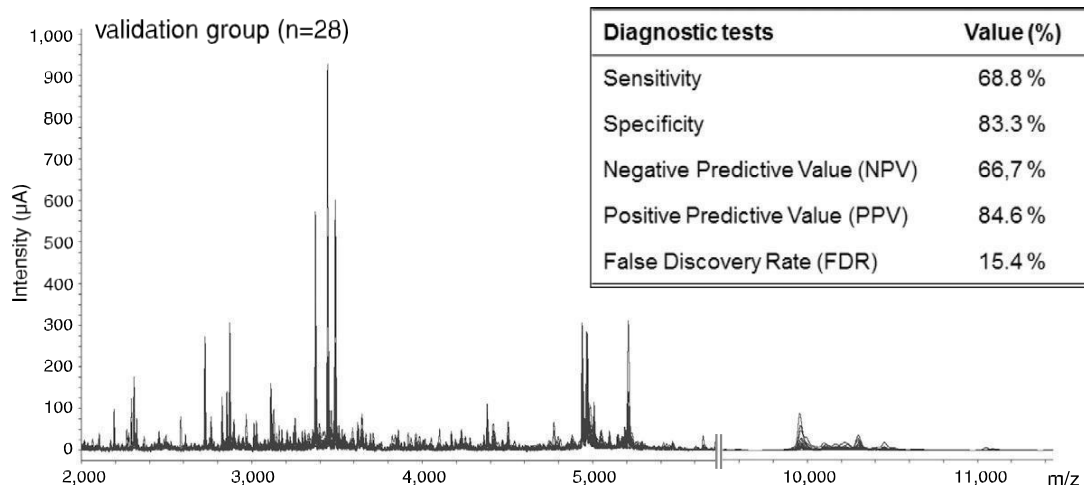


**Figure 3.** Diagnostic accuracy of the CART analysis. Diagnostic accuracy of the classification tree to differentiate mild and severe CRLM patients. The area under the ROC obtained from the CART analysis was 0.903.

resection is mainly based on several clinical indicators [9,10], with tumor-free interval being one of the most determinant. Indeed, it is known that the development of neoplastic recurrence within the first year after liver resection is associated with a worse outcome [10]. However, mortality and the potential degree of severity based on all these different risk scoring systems are not always closely related [13], as other variables may influence the prognosis of these patients. In this study, we observed that there was not a clear correlation between the theoretical risk factor obtained from Fong's score system and

the survival time. Particularly, 22 of the 57 CRLM patients included in the training group showed discrepancies. Therefore, the search for new tools capable of predicting survival still remains an open challenge.

In the present study, we used a high-throughput proteomic technique to unveil a differential proteomic signature among CRLM patients based on their survival time. SELDI-TOF-MS, which is based on matrix-assisted laser desorption/ionization TOF-MS, has been used as a proteomic strategy in several studies to detect and identify potential biomarkers related to many different diseases including colorectal cancer [17–21]. It combines a solid-phase chromatographic surface with TOF-MS that enables the analysis of crude samples such as tissue lysate, saliva, serum, urine, etc. Sample fractionation is performed previously to reduce sample complexity, thus enabling the detection of low-abundance proteins. In the current study, tumor tissue samples were fractionated by anion exchange chromatography, and the third eluate was analyzed by MS. The solid-phase chromatographic surface was selected based on the highest number of protein peaks detected and the highest total signal intensity analyzed in a preliminary study. Using this procedure, we detected 118 protein peaks over a range of 1 to 25 kDa. Three protein peaks with  $m/z$  values of 2726, 3251, and 9950 were statistically significant. However, none of these peaks clearly differentiated mild from severe CRLM patients. Therefore, we performed a CART analysis which showed that the expression of four different protein peaks was the most relevant protein combination to classify these patients according to survival. Among these peaks, only the one located at  $m/z$  2726 was statistically significant. The other three protein peaks selected in the CART analysis did not coincide with any of those that were statistically significant. This feature is not surprising because the protein peaks which best separate the different smaller subsets obtained during the CART analysis are not necessarily the same as those that are globally statistically significant between both groups.



**Figure 4.** SELDI-TOF-MS proteomic profile and diagnostic tests from the validation group. Two portions of the SELDI-TOF-MS spectra from the 28 CRLM patients that comprised the blinded validation group. The first segment ranges from  $m/z$  2000 to 5500, and the second is comprised between  $m/z$  9500 and 11,000. As observed, the proteomic signature was very similar to that of the training group. The insert shows the diagnostic tests (sensitivity, specificity, NPV, and PPV) performed to further strengthen the clinical relevance of the diagnostic algorithm.

There are few studies focused on the proteomic profiles of CRLM patients [22,23]. These investigations are mainly related to predicting neoplastic recurrence after CRLM resection and metachronous liver metastasis from colorectal cancer in serum samples. However, none of these investigations has explored the tumor proteomic signature to predict survival. Therefore, we first performed a proteomic analysis in 57 liver tumor samples from CRLM patients to assess whether there is a differential proteomic profile between patients with a greater or less than 5-year survival. As mentioned above, CART analysis revealed four protein peaks enabling the classification of CRLM patients and thus their outcome. These results were further validated in a new group of CRLM patients possessing similar clinical characteristics to those observed in the training group. Of note was that the specificity and the PPV values obtained in the validation set (83.3% and 84.6%, respectively) were very similar to those previously determined in the training group. However, those corresponding to sensitivity and NPV were lower (68.8% and 66.7%, respectively).

CART analysis has proven to be a relevant strategy to predict the response of cancer patients to treatment [24] and the prognosis of disorders other than colorectal cancer, including chronic myelomonocytic leukemia or pulmonary complications after lung resection [25,26]. One of the major advantages of CART analysis is the simple and intuitive nature of this algorithm. In comparison to traditional regression methods, in which the prognostic score is obtained as a weighted average of several biochemical and clinical factors, CART classifies patients into groups based on simple combinations of the patients' characteristics [27]. In the current investigation, CART analysis resulted in the identification of 4 protein peaks able to discriminate CRLM patients with a survival time of longer than 5 years from those with shorter survival periods. Therefore, by using the algorithm obtained, it is possible to predict the survival time of these subjects at the time of tumor resection with a remarkable sensitivity and specificity.

A major issue emerging from these results is related to the identification of the different peaks included in the CART analysis. However, although this information could be very relevant to better understand the mechanisms involved in colorectal carcinoma metastases, the identification of these peaks would not result in an improvement in the performance of the algorithm as a prognostic indicator of survival.

In conclusion, the results presented in the current investigation indicate that proteomic analysis of liver tumor samples from CRLM patients may be useful to determine their 5-year survival. The use of a classification tree allowed the identification of four protein peaks with clear clinical relevance. This finding was validated in another set of CRLM patients, further strengthening its diagnostic value. These results, therefore, set the rationale to perform future studies focused on the identification of these four protein peaks. In addition, they could provide valuable insight into the altered molecular signaling pathways that are involved in the survival of patients with CRLM.

### Ethical Conduct of Research

The authors state that they have obtained written informed consent from all patients included in the study when they were proposed for surgery, and the investigation was approved by the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona following the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

### Competing Interests

The authors do not have any more disclosures to report.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2016.08.002>.

### References

- [1] Siegel R, Desantis C, and Jemal A (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* **64**, 104–117.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, and Jemal A (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**, 87–108.
- [3] Sheth KR and Clary BM (2005). Management of hepatic metastases from colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg* **18**, 215–223.
- [4] Ruers T and Bleichrodt RP (2002). Treatment of liver metastases, an update on the possibilities and results. *Eur J Cancer* **38**, 1023–1033.
- [5] Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, and Starling N (2010). Colorectal cancer. *Lancet*. **375**, 1030–1047.
- [6] Khatri VP, Petrelli NJ, and Belghiti J (2005). Extending the frontiers of surgical therapy for hepatic colorectal metastases. Is there a limit? *J Clin Onc* **23**, 8490–8499.
- [7] Mentha G, Terraz S, Andres A, Toso C, Rubbia-Brandt L, and Majno P (2013). Operative management of colorectal liver metastases. *Semin Liver Dis* **33**, 262–272.
- [8] Vibert E, Canedo L, and Adam R (2005). Strategies to treat primary unresectable colorectal liver metastases. *Semin Oncol* **32**, 33–39.
- [9] Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, and Jaeck D (1996). Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver: a prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Francaise de Chirurgie. *Cancer* **77**, 1254–1262.
- [10] Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, and Blumgart LH (1999). Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* **230**, 309–321.
- [11] Iwatsuki S, Dvorchik I, Madariaga JR, Marsh JW, Dodson F, Bonham AC, Geller DA, Gayowski TJ, Fung JJ, and Starzl TE (1999). Hepatic resection for metastatic colorectal adenocarcinoma: a proposal of a prognostic scoring system. *J Am Coll Surg* **189**, 291–299.
- [12] Schindl M, Wigmore SJ, Currie EJ, Laengle F, and Garden OJ (2005). Prognostic scoring in colorectal cancer liver metastases: development and validation. *Arch Surg* **140**, 183–189.
- [13] Zakaria S, Donohue JH, Que FG, Farnell MB, Schleck CD, Ilstrup DM, and Nagorney DM (2007). Hepatic resection for colorectal metastases: value for risk scoring systems? *Ann Surg* **246**, 183–191.
- [14] Marti J, Fuster J, Solà AM, Hotter G, Molina R, Pelegrina A, Ferrer J, Deulofeu R, Fondevila C, and García-Valdecasas JC (2013). Prognostic value of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in metastatic and nonmetastatic colorectal cancer. *World J Surg* **37**, 1103–1109.
- [15] Tejpar S (2007). The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **21**, 1071–1087.
- [16] Marti J, Modolo MM, Fuster J, Comas J, Cosa R, Ferrer J, Molina V, Romero J, Fondevila C, Charco R, et al (2009). Prognostic factors and time-related changes influence results of colorectal liver metastases surgical treatment: a single-center analysis. *World J Gastroenterol* **15**, 2587–2594.
- [17] Marfà S, Crespo G, Reichenbach V, Fornis X, Casals G, Morales-Ruiz M, Navasa M, and Jiménez W (2014). Lack of a 5.9 kDa peptide C-terminal fragment of fibrinogen  $\alpha$  chain precedes fibrosis progression in patients with liver disease. *PLoS One* **9**, e109254.
- [18] Li Y, Wu J, Zhang W, Zhang N, and Guo H (2013). Identification of serum CCL15 in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **108**, 99–106.
- [19] Chung L, Moore K, Phillips L, Boyle FM, Marsh DJ, and Baxter RC (2014). Novel serum protein biomarker panel revealed by mass spectrometry and its prognostic value in breast cancer. *Breast Cancer Res* **16**, R63.
- [20] Asano T, Koizumi S, Takagi A, Hatori T, Kuwabara K, Fujino O, and Fukunaga Y (2011). Identification of a novel biomarker candidate, a 4.8-kDa peptide fragment from a neurosecretory protein VGF precursor, by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from children with acute encephalopathy using SELDI-TOF-MS. *BMC Neurol* **11**, 101.
- [21] Yuan Y, Tan CW, Shen H, JK Y, Fang XF, Jiang WZ, and Zheng S (2012). Identification of the biomarkers for the prediction of efficacy in first-line

- chemotherapy of metastatic colorectal cancer patients using SELDI-TOF-MS and artificial neural networks. *Hepatology* **59**, 2461–2465.
- [22] Martí J, Fuster J, Estanyol JM, Fernández F, Deulofeu R, Ferrer J, Pelegrina A, Reyes A, Fondevila C, and García-Valdecasas JC (2013). Clinical and prognostic usefulness of serum proteomic profile in hepatic colorectal metastases: a pilot prospective study. *Clin Transl Oncol* **15**, 691–697.
- [23] Zhu D, Zhong Y, Wu H, Ye L, Wang J, Li Y, Wei Y, Ren L, Xu B, Xu J, et al (2013). Predicting metachronous liver metastasis from colorectal cancer using serum proteomic fingerprinting. *J Surg Res* **184**, 861–866.
- [24] Cecchin E, Agostini M, Pucciarelli S, De Paoli A, Canzonieri V, Sigon R, De Mattia E, Friso ML, Biason P, Visentin M, et al (2011). Tumor response is predicted by patient genetic profile in rectal cancer patients treated with neo-adjuvant chemo-radiotherapy. *Pharmacogenomics J* **11**, 214–226.
- [25] Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH, Glassman AB, Albitar M, Kwari MI, and Beran M (2002). Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* **99**, 840–849.
- [26] Kim JY, Hildebrandt MA, Pu X, Ye Y, Correa AM, Vaporciyan AA, Wu X, and Roth JA (2012). Variations in the vascular endothelial growth factor pathway predict pulmonary complications. *Ann Thorac Surg* **94**, 1079–1084.
- [27] Savas S, Liu G, and Xu W (2013). Special considerations in prognostic research in cancer involving genetic polymorphisms. *BMC Med* **11**, 149.

## DISCUSIÓN

---

---



## 7.-DISCUSIÓN:

El CCR es un importante problema de salud, es la tercera patología maligna más frecuente a nivel mundial. Aproximadamente el 75% de los CCR son esporádicos y el 25% de origen hereditario o provenientes de patología heredo-familiar. La mayor incidencia del CCR se registra en países de Europa, América del Norte y Oceanía; es causante de alrededor de 600.000 muertes al año en el mundo siendo las MHCR la principal causa de muerte en estos pacientes (114, 188). En la actualidad los equipos multidisciplinarios especializados para el tratamiento de las MHCR están enfocados en definir el tratamiento óptimo de primera línea en pacientes con MHCR, una estrategia de mantenimiento apropiada y la necesidad imperiosa de información más detallada acerca de la biología molecular de las MHCR (27, 114, 189).

El hígado tiene un alto flujo venoso portal a través de los sinusoides hepáticos, lo que explica la razón por la cual es la diana más frecuente para las metástasis de CCR siendo la principal causa de muerte en los casos de CCR (15). La resección hepática (R0) con márgenes de resección libres de tumor mayor o igual a 1 cm., es el único tratamiento que ofrece posibilidad de curación y una larga supervivencia. La cirugía ofrece actualmente una tasa de mortalidad <3% y una supervivencia a 5 años en más de un tercio de los casos (hasta un 45%) y una supervivencia a 10 años entre un 22% a 25% (15, 57). La resección quirúrgica (R0) es considerada como parte del tratamiento, teniendo en cuenta la importancia de la terapia adyuvante adecuada en un contexto de tratamiento multidisciplinario en centros especializados con los conocimientos y herramientas necesarias para ofrecer la resección quirúrgica ideal de las MHCR (15, 57).

Los criterios de FONG logran ser factores predictivos pronósticos en los casos de MHCR con score de Fong =5 (con supervivencia pobre) y pacientes con Score de Fong =0 o 1 (con buenos pronósticos). Pero en casos de pacientes con Score de Fong= 2, 3 o 4 debe considerarse la necesidad de realizar estudios para mejorar una guía pronóstica más fiable y que ofrezcan óptima orientación para los tratamientos adyuvantes en cada caso (15).

Pacientes con Score de Fong 0, 1 y 2 tienen los mejores pronósticos y en estos casos la cirugía (R0) es el pilar fundamental en el tratamiento de las MHCR. En los casos con scores de Fong 3, 4 y 5 el pronóstico es más incierto. En los casos de score de Fong=5, con pobres resultados a largo plazo, la resección quirúrgica sin una efectiva terapia adyuvante es muy cuestionable y empobrece aún más el resultado (15). En los casos de MHCR potencialmente resecables, la terapia de conversión pre-operatoria óptima es fundamental, pero en la actualidad no están bien definidos los biomarcadores que permitan elegir el agente biológico óptimo o quimioterapia óptima para cada caso (39).

En los últimos años, la medicina ha dado algunos pasos importantes hacia un cambio de paradigma que podría encaminarse hacia las terapias personalizadas. En la próxima década, el tratamiento del cáncer se moverá de un enfoque reactivo a una disciplina proactiva. La oncología personalizada es la medicina individualizada basada en la evidencia que proporciona la atención adecuada al paciente con cáncer y su resultado se refleja en mejoras medibles en los resultados positivos en los pacientes y una reducción en los costos de atención en salud. La esencia de la oncología personalizada radica en el uso de biomarcadores que pueden ser de tejido, suero, orina o de imágenes y deben ser validados. La oncología personalizada basada en biomarcadores ya está teniendo un impacto notable. Tres tipos diferentes de biomarcadores son de particular importancia: biomarcadores de predicción, biomarcadores pronósticos y biomarcadores de respuesta temprana. Una identificación más eficiente, el uso de los biomarcadores ya conocidos y de los potenciales futuros biomarcadores, podrían ser la clave para acelerar este progreso. Los biomarcadores basados en las intervenciones genéticas y moleculares, se han convertido en herramientas cada vez más importantes en la investigación, el desarrollo de medicamentos y en la práctica clínica. En resumen, los biomarcadores son claves como diagnóstico molecular para identificar probabilidades de respuesta positiva a las terapias oncológicas dirigidas de manera individual. El diagnóstico molecular incluye pruebas para los genes, la expresión de genes, proteínas y metabolitos. Se espera que el uso de diagnósticos moleculares crezca de manera significativa en el

futuro y se integre efectivamente en las nuevas terapias contra el cáncer un solo paquete (incluido) que proporcionará una mayor eficiencia de los tratamientos y sea costo-efectivo. Este enfoque representa una oportunidad única para la oncología personalizada. (190, 191, 192, 193, 194).

Dentro de los avances tecnológicos que apoyan este enfoque, se incluyen las tecnologías de imagen como la tomografía computarizada (TC) y la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) que ya están influyendo en la detección temprana y el tratamiento del paciente con cáncer (195).

El desarrollo del CCR y las MHCR implica modificaciones subyacentes a nivel genético / epigenético y molecular en general (129). En la actualidad se cuenta en la práctica clínica con estudios como test de mutación en el gen KRAS para la selección de la más apropiada línea de tratamiento sistémico para las MHCR (103, 119, 120, 184). Aún están bajo investigación otras alternativas para los hallazgos de biomarcadores que orienten más acerca de cuál es el tratamiento ideal para cada caso (25, 27, 121, 184).

El avance en las opciones terapéuticas en los últimos 15 años ha aumentado la sobrevida mediana de 12 a 24 meses (25). Actualmente, entre un 60% y 70 % de los pacientes con MHCR reciben diferentes protocolos de quimioterapia en combinación con anticuerpos anti VEGF y anticuerpos anti EGFR. La expresión de los factores de crecimiento EGFR y VEGF, se evalúa con inmunohistoquímica y se expresan en el 30 a 85 % de los pacientes con CCR. La contradicción en los hallazgos del EGFR por inmunohistoquímica es tan diversa que en las evaluaciones clínicas muchas veces no predice de manera fiable el resultado clínico del tratamiento y no es requerimiento fundamental el ser demostrada la presencia de EGFR para la selección de pacientes con probable eficacia terapéutica con los Ac anti EGFR (25, 154, 161, 162). La alta expresión de genes de VEGF ha coincidido con la resistencia a cetuximab. Conforme a las pruebas de la expresión génica, los pacientes con MHCR con tumores que tienen un alto nivel de expresión del ligando de EGFR anfiregulina y EGFR epirregulina responden mejor al tratamiento con cetuximab que aquellos con niveles más bajos de expresión de estos ligandos (122).

Para la toma de decisión acerca del tratamiento ideal en la actualidad aún se requieren más estudios para encontrar biomarcadores predictivos claves para orientar al tratamiento o la selección del agente biológico ideal en la primera línea de quimioterapia en los determinados casos (127).

En la necesidad de entender la base genética-molecular y sus mecanismos o vías de conducción para ser aplicados en la práctica clínica y conseguir efectividad en resultados de tratamientos, disminución de efectos colaterales en casos que no responden a tratamientos usados erróneamente y mayor costo efectividad, muchos grupos de investigadores se concentran en estudios genéticos y proteómicos en CCR y su relación con las metástasis por CCR, recidivas tempranas y pronóstico, además de los ya mencionados (129, 130, 131, 132).

A nivel proteómico y molecular es de mucha utilidad en la práctica clínica el antígeno Carcino embrionario (CEA), a pesar de no ser específico para los casos de CCR y MHCR. En los últimos años han sido sugeridos como posibles biomarcadores séricos en CCR el inhibidor de metaloproteinasa tisular-1 (TIMP-1), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), Osteopontina, matriz metaloproteinasa-7 (MMP-7), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (133, 195, 196, 197). También es sugerido como potencial biomarcador a la proteína factor de crecimiento Insulina/afín II-3 mRNA (IMP3) que juega importante papel en la carcinogénesis encontrado en los nódulos linfáticos metastásico de CCR primario y en el tumor primario (144) y el Factor de Transcripción RUN2 (RUNX2) en el tejido tumoral del CCR asociado a la proliferación celular, migración y propiedades invasivas (145). Hay estudios que sugieren que la supresión de ciertas proteínas como la proteína smoothed (SMO) en el tejido tumoral en el CCR es significativo en su relación con la aparición de MHCR (147); la sobre-expresión aberrante de la proteína musashi1 (MSI-1) en el CCR durante la presencia de MHCR (148); la expresión de hBiot2 en el CCR (149); sobre-expresión del CDC20 esencial cofactor promotor de la anafase del (APC/C) expresado en el CCR entre otros tipos de canceres (141); la baja regulación la proteína BRD7, cofactor del P53 y su baja regulación podría estar relacionada con el mal pronóstico del CCR (134); la

baja expresión de la proteína BRCA1 es sugerido también como biomarcador de mal pronóstico en CCR (198). Estos son posibles biomarcadores sugeridos como respuesta a múltiples estudios realizados con el afán de identificar expresiones moleculares que puedan sugerir un tratamiento ideal para cada caso de CCR. Ver tabla 3b.

Actualmente han sido poco estudiados y son poco conocidos los mecanismos fisiopatológicos moleculares intracelulares y su influencia en la invasión y progresión en las MHCR. No existe un análisis concreto que describa las perturbaciones sistémicas dentro de la red de señalización de las proteínas dentro de las MHCR y aún no se han realizado estudios al respecto. Estudios recientes muestran diferencias en la arquitectura molecular del CCR primario y su influencia en la agresividad en su comportamiento e incidencia en la aparición de metástasis y recidivas tumorales (114). Hay muchos estudios recientes que se refieren a posibles marcadores séricos como factores pronósticos de CRC, pero no ha sido estudiado específicamente en las MHCR. Ejemplos de algunos de estos estudios están en la (Tabla 3a y 3b).

A nivel molecular, la desregulación en la traducción en las síntesis de proteína en las células tumorales está implicada en la transformación celular. Ha sido documentado el Flujo aberrante a través de vías de señalización que inciden en el proceso de traducción y las perturbaciones en los niveles relativos de los factores de iniciación de la traducción reguladora de la síntesis de proteínas en las células en varios tipos de cáncer humano. El control de traducción juega un papel importante en la conformación del proteoma celular metastásico. Es bien sabido que las alteraciones en los niveles y actividades dentro del proceso de la traducción del ARNm y de las proteínas intracelulares son únicas para los diferentes tipos de cánceres en las diferentes etapas de la enfermedad (195).

El proceso por el cual se forman proteínas consta de dos etapas, la primera es la traducción del ARN mensajero (ARNm), en la que los aminoácidos de un polipéptido son ordenados con precisión de la información contenida en la secuencia de nucleótidos de ADN. En la segunda etapa son las modificaciones postraduccionales que sufren

polipéptidos formados hasta su estado como una proteína funcional. La traducción es la etapa más importante la síntesis de proteínas, pero las modificaciones post trasduccionales pueden generar proteínas diferentes a su original con consecuencias importantes en el comportamiento celular. (28)

La desregulación en la traducción en la síntesis de proteínas en las células tumorales está implicada en el mecanismo de la transformación celular. Recientemente, los estudios han mostrado que la desregulación de la traducción del ARNm contribuye al fenotipo metastásico a través de efectos selectivos sobre la traducción del ARNm cuyos productos están implicados en diversas etapas de la metástasis, incluyendo la migración, invasión, la angiogénesis, la difusión y la activación de la supervivencia de células tumorales en la siembra metastásica en sitios distantes (163). Se ha documentado flujo aberrante a través de vías que afectan el proceso de traducción y alteraciones en los niveles relativos de los factores de iniciación de la traducción de regulación de la síntesis de proteínas en las células de varios tipos de cáncer humano. Por lo tanto, el control de la traducción desempeña un papel importante en la formación del proteoma celular metastásico y un paso clave en la etapa de regulación de la síntesis de proteínas es el de enviar la información característica predeterminada contenida en el RNAm a los ribosomas. Este paso no sólo compromete el ARNm como un factor determinante en la síntesis de proteínas, sino también a menudo se piensa que determina la velocidad del proceso de traducción (195). En la actualidad hay un interés clínico en la comprensión de los procesos de traducción proteica y todo comportamiento microbiológico que interviene en la fisiopatología con el fin de poder desarrollar terapias específicas potencialmente curativas contra el cáncer; tener el control de la traducción constituye una nueva e importante área en el desarrollo de fármacos para el cáncer humano en general y de la misma manera es un campo fundamental a estudiar para encontrar factores específicos que pueden servir como marcadores que guíen en el tratamiento de los pacientes con cáncer (108).

Como resultado de todas estos esfuerzos por la consecución de biomarcadores claves en las MHCR, al día de hoy es fundamental el test

KRAS, las mutaciones en exones KRAS 12 y 13 son parámetros moleculares usados en la clínica práctica en la actualidad y algunos centros recomiendan hacer este test KRAS post cirugía del tumor primario para tener una opción terapéutica más orientada a la hora de presentar MHCR aún sin la presencia de las metástasis aunque esto podría implicar algunas pérdidas económicas en los casos de pacientes en los que esta prueba no tiene utilidad clínica (123, 124, 125).

Actualmente no hay diagnósticos moleculares predictivos precisos y es necesaria la obtención de otros marcadores predictivos además del KRAS para la optimización de resultados y minimizar la toxicidad innecesaria de los tratamientos en los pacientes con MHCR (25, 122). Están en estudio otros marcadores como BRAF, NRAS, mutaciones en el gen PIK3CA y pérdidas de expresiones del PTEN, pero aún no contamos con los marcadores moleculares biológicos suficientes como guía para la selección de un tratamiento ideal (25, 121).

En la actualidad los oncólogos tienen que elegir una de estas dos opciones: tratar a un gran número de pacientes con agentes anti-EGFR o anti VEGF que tienen efectos negativos sobre la calidad de vida y también reduce las posibilidades de conseguir un tratamiento adecuado para cada caso o, si los oncólogos se niegan a asumir riesgos, omiten el uso de un tratamiento anti-EGFR o anti VEGF en cuyo caso los pacientes en los que éste hubiera sido el tratamiento adecuado también se les niega la posibilidad de supervivencia más prolongada o recuperación a corto plazo (122).

Estos resultados de investigaciones en busca de biomarcadores aún requieren validación, pero abren camino para futuros estudios clínicos que puedan proporcionar mayor comprensión de la fisiopatología en el desarrollo de las MHCR y biomarcadores que sean de utilidad clínica para hacer efectivas las terapias oncológicas personalizadas y mayor costo efectividad en el tratamiento de las MHCR.

Sobre la base de lo evaluado y mencionado previamente se sugiere que hay un perfil proteómico específico en el tumor metastásico de tejido

hepático de pacientes con MHCR, el cual puede ser capaz de predecir el comportamiento clínico de la enfermedad en estos pacientes.

Existen pocos estudios enfocados en los perfiles proteómicos de los pacientes MHCR. Estas investigaciones se relacionan principalmente con la predicción de la recidiva neoplásica después de la resección de las MHCR. Sin embargo, ninguna de estas investigaciones ha explorado la posible existencia de un mapa o firma proteómica del tumor para predecir la supervivencia.

La aplicación de la tecnología proteómica al campo de la oncología (oncoproteómica) ha permitido el descubrimiento de biomarcadores neoplásicos que pueden mejorar el diagnóstico precoz, revelar nuevas terapias objetivas y ayudar con la elección del mejor tratamiento en cada caso. Permite medidas cuantitativas de las proteínas y permite estudiar los cambios de los perfiles proteómicos dentro de las diferentes etapas de la enfermedad neoplásica.

El presente, es el primer estudio de perfiles proteómicos con la técnica SELDI-TOF/MS en tejido tumoral MHCR. Está basado en la hipótesis de la existencia de un perfil proteómico específico en el tejido hepático tumoral de los pacientes con MHCR y que dicho perfil proteómico es capaz de predecir el comportamiento clínico de estos pacientes y ser la base de biomarcadores específicos que guíen a un tratamiento ideal coste-efectivo más personalizado.

Este estudio está enfocado a identificar los perfiles proteómicos específicos que pueden ser predictivos de comportamiento clínico específico de la enfermedad en pacientes con MHCR (con la intención de desarrollar marcadores de predicción / de recidiva y pronóstico de MHCR después de la resección hepática) para predecir la agresividad del tumor, el pronóstico clínico y conocer los posibles marcadores moleculares involucrados en el proceso de metástasis hepáticas.

En el primer estudio, los diferentes perfiles proteómicos en el tejido hepático obtenidos del grupo control y de los grupos con MHCR fueron significativamente diferentes y fue posible diferenciar a los pacientes con



MHCR, del grupo control a través de un pico de proteína (7371 m / z) que se suprimió casi completamente en pacientes con MHCR. Por lo tanto, el perfil proteómico del tejido hepático es una herramienta prometedora para el cribado de las MHCR. Esta utilidad potencial merece más estudios para confirmar y refinar su valor de selección completo.

Es posible formular varias hipótesis para explicar las diferencias entre determinados picos de proteína. La presencia, sustitución o inhibición de una o más proteínas es responsable de las diferencias entre los perfiles. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las diferencias en los perfiles proteicos pueden ser causados por la simple presencia de características epiteliales del colon y no por características neoplásicas.

Las puntuaciones clínicas han sido clásicamente utilizadas para estimar el pronóstico de los pacientes después de la resección de las MHCR, pero la evaluación del riesgo es limitada porque no incluyen los efectos de los últimos avances médicos sobre el pronóstico. Algunos autores han intentado aumentar su poder de predicción añadiendo algunas características clínicas o bioquímicas, pero los resultados no han sido universalmente aceptados. En esta dirección, el desarrollo de nuevas técnicas como la proteómica ha ofrecido la posibilidad de encontrar nuevas proteínas implicadas en la fisiopatología y mecanismos que influirían en el comportamiento clínico y progresión de las MHCR, ayudando así a determinar con más precisión, el pronóstico en estos pacientes.

En nuestro estudio, las muestras obtenidas, tratadas y analizadas con el uso del árbol de algoritmo CART en ambos grupos y con la construcción de una curva ROC, logró determinar los picos proteicos con m / z 2970 en los casos leves y m/z 2871 en los casos de MHCR graves, clasificando así con mayor precisión a cada grupo de MHCR con pronóstico distinto. Por lo tanto, concluimos que los péptidos que se expresan diferencialmente entre los grupos de MHCR leve y MHCR grave, no son el resultado de cualquier digestión enzimática artificial.

Para la validación del estudio anterior se tomaron muestras tumorales de MHCR en 85 pacientes para evaluar la posible existencia de una firma o patrón proteómico distintivo entre MHCR "leve" o "grave"

basado en la supervivencia a los 5 años. Se caracterizó por SELDI-TOF-MS y posteriormente se realizó un análisis de clasificación y árbol de regresión (CART). Se realizó la misma técnica proteómica utilizada en el estudio anterior, para desvelar una firma proteómica diferencial entre los pacientes con MHCR. Los picos de proteína que mejor diferenciaron a los pacientes con MHCR leves de los pacientes con MHCR graves fueron  $m/z$  2,726,  $m/z$  2,761,  $m/z$  3,110 y  $m/z$  4,939.

Se detectaron 118 picos de proteína en un rango de 1 a 25 kDa. Tres picos de proteína con valores  $m/z$  de 2.726, 3.251 y 9.950 fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, ninguno de estos picos diferenció claramente a los dos grupos de MHCR. Entre estos picos, sólo el localizado a  $m/z$  2,726 fue estadísticamente significativo. Los otros tres picos de proteína seleccionados en el análisis de CART no coincidieron con ninguno de los que fueron estadísticamente significativos. Esta característica no es sorprendente ya que los picos de proteína que mejor separan los diferentes subconjuntos más pequeños obtenidos durante el análisis CART no son necesariamente los mismos que los que son estadísticamente significativos entre ambos grupos.

Es de destacar que la especificidad y los valores de PPV obtenidos en el conjunto de validación (83,3% y 84,6%, respectivamente) fueron muy similares a los previamente determinados en el grupo de entrenamiento. Sin embargo, los correspondientes a sensibilidad y VPN fueron menores (68,8% y 66,7%, respectivamente).

Los resultados de este estudio también apoyan la teoría de la utilidad de una identificación de mapas proteómicos específicos que puedan ser de utilidad para establecer potenciales biomarcadores como factores pronósticos y orientadores a esquemas de tratamientos con máxima efectividad específicos para cada subtipo de pacientes con MHCR

El control de la traducción de cáncer tiene múltiples facetas e implica alteraciones en los niveles de factores de traducción y actividades únicas para cada uno de los diferentes tipos de cáncer, el estadio de la enfermedad y el microambiente del tumor. Existen en la actualidad varios estudios clínicos en marcha para apuntar a componentes específicos del sistema de

traducción y/o elementos de traslación para guiar la terapéutica del cáncer (195, 196, 197, 198, 200).

La correlación entre ciertos grupos de pacientes con diferente comportamiento evolutivo conocido y los perfiles de expresión proteómica podría predecir la conducta clínica (agresividad) de la enfermedad y con mayor precisión que los métodos clásicos actuales en relación con un grupo con mejor o peor pronóstico y supervivencia. Esta predicción orienta hacia futuros estudios moleculares más específicos para proporcionar un mejor tratamiento y seguimiento de las MHCR en cada caso, guiado por el hallazgo de un perfil proteómico específico. En el estudio de estos perfiles proteómicos se identifican proteínas que podrían ser utilizadas como marcador pronóstico y dar lugar a posibles cambios en el enfoque terapéutico en los determinados grupos de pacientes.

A pesar de que la puntuación de Fong es la clasificación clínica más válida para los pacientes MHCR, existe cierta controversia acerca del hecho de que no siempre predice con exactitud la supervivencia real del paciente. Creemos que nuestros resultados muestran el valor del perfil proteómico del tejido del hígado para predecir el pronóstico en MHCR, y podría ser potencialmente utilizado para guiar la selección del tratamiento para cada paciente.

Una de las características deseadas de los marcadores predictores pronóstico es la simplicidad, que tiene implicaciones tanto clínicas como económicas. Nuestro estudio mostró que un algoritmo CART con sólo dos picos de proteínas dio como resultados de la clasificación la posibilidad de discernir la ausencia o presencia de neoplasia y también la predicción del pronóstico después de la resección de las MHCR. Estas dos características en nuestros resultados hacen que la proteómica sea muy atractiva desde el punto de vista clínico y a primera vista sería interesante también conocer la expresión de picos proteicos específicos que conducen a la posibilidad implícita de conocer y regular su función. Sin embargo, la identificación directa de las proteínas con la tecnología SELDI-TOF-MS suele ser un procedimiento lento y complicado, que puede incluir potencialmente artefactos en los perfiles proteómicos y por estas razones, en este estudio

sólo nos hemos centrado en la identificación de un perfil proteómica global relacionado con las características clínicas de cada grupo.

Nuestro estudio es el primero en identificar con éxito perfiles proteómicos específicos en el tejido hepático, que puede ayudar a diferenciar a los sujetos con hígado sano de los pacientes con MHCR y clasificar la severidad del comportamiento de las MHCR, sin embargo, a pesar de los resultados, el diseño preliminar de este estudio, aún debe ser seguido por estudios confirmatorios que incluyan más y diferentes pacientes (permitiendo la comparación en células normales del colon, células colorrectales primarias, las células de MHCR y las células hepáticas no malignas adyacentes a las MHCR) y que apunten especialmente a la identificación y posterior validación de marcadores predictores de mejor y peor pronóstico de las MHCR, la inclusión y estratificación de varios factores pronósticos conocidos del tumor que no forman parte de la puntuación de Fong.

Aunque las muestras de hígado son las más específicas para diagnosticar MHCR, no son las muestras ideales para predecir el pronóstico de los pacientes ya que requieren técnicas de obtención invasivas. Una posible solución a esta limitación sería evaluar la correspondencia entre los perfiles proteómicos de las MHCR y la proteómica simultánea en muestras más fácilmente accesibles como sangre o bilis. Por todas estas razones, consideramos que los estudios futuros también deberían investigar las correlaciones entre los perfiles proteómicos en muestras de hígado y muestras más accesibles. Para concluir se espera que, en el futuro, nuevas tecnologías biológicas aumentarán la sensibilidad para detectar sustancias derivadas de tumores y otras enfermedades. De esta manera tendríamos la posibilidad de contar con parámetros biológicos como factores pronósticos con suficiente sensibilidad y especificidad para guiar nuestras decisiones sobre tratamientos complementarios y seguimiento específico.

Este estudio fue presentado como una comunicación oral 63ª Reunión Anual de la Asociación Americana para la Estudio de enfermedades hepáticas (9-13 de noviembre de 2012. Boston, MA, EE.UU.).



## CONCLUSIONES

---

---

## 8.- CONCLUSIONES

Para obtener los objetivos planteados en esta tesis se han estudiado un total de 10 tejidos hepáticos sanos y 105 tejidos de MHCR, 20 en el estudio piloto y 85 en el estudio para validación. En este grupo de casos estudiados, se ha conseguido definir un perfil proteómico específico en el tejido hepático tumoral de los pacientes con MHCR. A partir de los resultados obtenidos, se puede dar respuesta a las preguntas planteadas en la hipótesis de trabajo.

**¿Existe un perfil proteómico específico en el tejido hepático tumoral de los pacientes con MHCR? ¿Este perfil proteómico es capaz de predecir el comportamiento clínico de estos pacientes, y por lo tanto orientar hacia el mejor tratamiento en cada uno de ellos?**

**SI. Existe un perfil proteómico específico en el tejido hepático tumoral de los pacientes con MHCR.** Se logró establecer una clara diferencia entre los perfiles proteómicos de casos sanos y casos de enfermos con MHCR.

**SI. El perfil proteómico es capaz de predecir el comportamiento clínico de estos pacientes, y por lo tanto orientar hacia el mejor tratamiento en cada uno de los casos.**

Para verificar esta hipótesis se cumplió el **objetivo principal** al establecer perfiles proteómicos específicos en los casos de hígados sanos y en cada grupo de pacientes con MHCR.

1a.- **Establecer una comparación entre los perfiles proteómicos de casos sanos y casos de enfermos con MHCR.** La proteína con m/z de 7.371 D. la cual está casi suprimida en pacientes con MHCR en comparación con el grupo control ( $P < 0.0001$ ), y la proteína localizada en 7.929 m / z, mostró también muy bajos niveles o estar suprimida en los casos de pacientes con MHCR en comparación con los casos control ( $p < 0,001$ ). El pico situado a m/z 2462 Da. que mostró una diferencia clara entre los grupos control y el grupo con MHCR ( $p < 0.005$ ).

1b.- **Identificar diferencias entre los perfiles proteómicos en los tres grupos que puedan ser utilizados como marcadores moleculares que pronostiquen precozmente el comportamiento clínico después de la resección quirúrgica de las MHCR.** Existe un perfil proteómico que identifica a los diferentes grupos pronósticos basados en los criterios de Fong y en la supervivencia a 5 años. El pico de m/z 2871 Da ( $p < 0,01$ ) y m/z 2492 Da ( $p < 0,01$ ) identificadas en el grupo de MHCR graves. El pico 2970 identificado en los casos leves ( $p < 0,051$ ), con una sensibilidad del 100 % y especificidad del 90 %. La proteína m/z 3,420 Da predomina en los casos de MHCR leves ( $p < 0,005$ ). El estudio de validación mostró los picos m/z 2726, m/z 2761 y m/z 3110 que diferencian los dos grupos basados en la supervivencia a 5 años.

2.- **Encontrar una correlación entre la expresión de un panel de proteínas y la agresividad del tumor de acuerdo con los criterios pronóstico de Fong.** Se encontraron diferencias significativas en los mapas de proteínas entre los grupos con MHCR leves y graves (basados en los criterios de Fong). Fueron detectadas 21 proteínas que mostraron diferencias entre los dos grupos con valores p significativos. Se generó un árbol de clasificación de 4 nodos que fue capaz de distinguir el grupo control, los pacientes con pronóstico leve y pronóstico grave por la combinación de los picos situados a m/z 1789, 2970, 2871 Da, obteniendo una curva ROC de 0,994, 0,947 y 0,952 respectivamente.

El análisis de los perfiles proteómicos en tejido hepático por el sistema SELDI-TOF/MS, es una herramienta útil para la identificación de nuevos biomarcadores en pacientes con MHCR.





## BIBLIOGRAFIA

---

---

## 9. BIBLIOGRAFIA

- 1) Favoriti P1, Carbone G1, Greco M1, Pirozzi F2, Pirozzi RE3, Corcione F1. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates Surg.* 2016 Mar; 68 (1): 7-11.
- 2) Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62: 10-29.
- 3) J. Ferlay a, E. Steliarova-Foucher a, J. Lortet-Tieulent a, S. Rosso b, J.W.W. Coebergh c, H. Comber e, D. Forman a, F. Bray a, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* (2013) 49, 1374- 1403.
- 4) Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013 Jan; 63(1): 11-30. Epub 2013 Jan 17.
- 5) Hasselgren K<sup>1</sup>, Sandström P<sup>1</sup>, Björnsson B<sup>1</sup>. Role of associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy in colorectal liver metastases: a review. *World J Gastroenterol.* 2015 Apr 21; 21(15): 4491-8
- 6) Siegel R<sup>1</sup>, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jul-Aug; 62 (4): 220-41.
- 7) Torre LA<sup>1</sup>, Siegel RL<sup>2</sup>, Ward EM<sup>3</sup>, Jemal A<sup>2</sup>. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016 Jan; 25 (1): 16-27.
- 8) Ait Ouakrim D<sup>1</sup>, Pizot C<sup>2</sup>, Boniol M<sup>2</sup>, Malvezzi M<sup>3</sup>, Boniol M<sup>4</sup>, Negri E<sup>5</sup>, Bota M<sup>4</sup>, Jenkins MA<sup>1</sup>, Bleiberg H<sup>6</sup>, Autier P<sup>7</sup>. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ.* 2015 Oct 6; 351
- 9) Douaiher J<sup>1</sup>, Ravipati A<sup>2</sup>, Grams B<sup>1</sup>, Chowdhury S<sup>3</sup>, Alatis O<sup>4</sup>, Are C<sup>1</sup>. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol.* 2017 Feb 13.
- 10) Arnold M<sup>1</sup>, Sierra MS<sup>1</sup>, Laversanne M<sup>1</sup>, Soerjomataram I<sup>1</sup>, Jemal A<sup>2</sup>, Bray F<sup>1</sup>. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2016 Jan 27.
- 11) Meriggi F, Bertocchi P, Zaniboni A. Management of potentially resectable colorectal cancer liver metastases. *World J Gastrointest Surg.* 2013 May 27; 5(5): 138-45.
- 12) Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. *Lancet* 2010; 375(9719): 1030-47.
- 13) Juez I, Rubio C, Figueras J. Multidisciplinary approach of colorectal liver metastases. *Clin Transl Oncol.* 2011 Oct; 13(10):721-7.
- 14) Abbas S<sup>1</sup>, Lam V, Hollands M. Ten-year survival after liver resection for colorectal metastases: systematic review and meta-analysis. *ISRN Oncol.* 2011; Epub 2011 Jun 22.
- 15) Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999; 230:309-318.
- 16) Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, Jaeck D. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie. Cancer* 1996; 77: 1254-62.
- 17) Wang Y, Liu YF, Cheng Y, Yi DH, Li P, Song WQ, Fu DZ, Wang X. Prognosis of colorectal cancer with liver metastasis: value of a prognostic index. *Braz J Med Biol Res* 2010 43; 11: 1116- 1122.

- 18) Tejpar S. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007 21(6): 1071-87.
- 19) Khatri VP, Petreli NJ, Belghiti J. Extending the frontiers of surgical therapy for hepatic colorectal metastases. Is there a limit? *J Clin Onc* 2005; 23 (33): 8490-99.
- 20) Kassahun WT<sup>1</sup>. Unresolved issues and controversies surrounding the management of colorectal cancer liver metastasis. *World J Surg Oncol*. 2015 Feb 18; 13: 61
- 21) Adam R, De Gramont A, Figueras J, Guthrie A, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, Tabernero J, Teh C, Van Cutsem E; Jean-Nicolas. The oncosurgery approach to managing liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Oncologist*. 2012; 17(10): 1225-39.
- 22) Seibert V, Ebert MP, Buschmann T. Advances in clinical cancer prote-omics: SELDI-TOF-mass spectrometry and biomarker discovery. *Brief Funct Genomics Proteomics* 2005; 4: 116-26.
- 23) Lawrie LC, Fothergill JE, Murray GI. Spot the differences: proteomics in cancer research. *Lancet Oncol* 2001; 2(5): 270-277.
- 24) Jemal A<sup>1</sup>, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr; 61(2): 69-90. Epub 2011 Feb 4.
- 25) Hocking CM<sup>1</sup>, Price TJ<sup>2</sup>; Panitumumab in the management of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol*. 2014 Jan; 7(1): 20-37.
- 26) Wu S<sup>1</sup>, Gan Y, Wang X, Liu J, Li M, Tang Y. PIK3CA mutation is associated with poor survival among patients with metastatic colorectal cancer following anti-EGFR monoclonal antibody therapy: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 May; 139(5):891-900. Epub 2013 Feb 24.
- 27) Aprile G, Lutrino SE, Ferrari L, Casagrande M, Bonotto M, Ongaro E, Puglisi F. Evidence based appraisal of the upfront treatment for unresectable metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 14; 19(46): 8474-88.
- 28) Huang CJ, Teng HW, Chien CC, Lin JK, Yang SH. Prognostic Significance of C-Reactive Protein Polymorphism and KRAS/BRAF in Synchronous Liver Metastasis from Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2013 Jun 3; 8(6).
- 29) Ribeiro HS, Stevanato-Filho PR, Costa Jr WL, Diniz AL, Herman P, Coimbra FJ. Prognostic factors for survival in patients with colorectal liver me-tastases: experience of a single brazilian cancer center. *Arq Gastroenterol*. 2012 Dec; 49(4): 266-72.
- 30) Huang J, Pan C, Hu H, Zheng S, Ding L. Osteopontin-enhanced hepatic metastasis of colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2012; 7(10): e47901.
- 31) Vibert E, Canedo L, Adam R. Strategies to treat primary unresectable colorectal liver metastases. *Semin Oncol* 2005; 32(6, Suppl 8): 33-9.
- 32) Martins SF, Garcia EA, Luz MA, Pardal F, Rodrigues M, Filho AL. Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2013 Mar-Apr; 10(2):55-67.
- 33) Krause P, Flikweert H, Monin M, Seif Amir Hosseini A, Helms G, Cantanhede G, Ghadimi BM, Koenig S. Increased growth of colorectal liver metastasis following partial hepatectomy. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Jun; 30(5): 681-93.
- 34) Zhao DB, Gao JD, Shan Y, Zhou ZX, Yuan XH, Wu JX, Shao YF. [Characteristics of metastasis and recurrence following curative resection for colonic carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2006 Jul; 9(4):291-3.

- 35) Ghittoni G, Caturelli E, Viera FT. Intrabiliary duct metastasis from colonic adenocarcinoma without liver parenchyma involvement: contrast enhanced ultrasonography detection. *Abdom Imaging*. 2010 Jun; 35(3):346-8.
- 36) Hsu YN, Lin JK, Chen WS, Lin TC, Yang SH, Jiang JK, Chang SC, Yen CC, Tzeng CH, Teng HW. A new classification scheme for recurrent or metastatic colon cancer after liver metastasectomy. *J Chin Med Assoc*. 2011 Nov; 74(11): 493-9.
- 37) Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008; 5(10): 588-599.
- 38) Huang MY, Chen MJ, Tsai HL, Kuo CH, Ma CJ, Hou MF, Chuang SC, Lin SR, Wang JY. Prospective analysis of KRAS wild-type patients with metastatic colorectal cancer using cetuximab plus FOLFIRI or FOLFOX4 treatment regimens. *Genet Mol Res*. 2011 Oct 3; 10(4): 3002-12.
- 39) Silvestri A, Calvert V, Belluco C, Lipsky M, De Maria R, Deng J, Colombatti A, De Marchi F, Nitti D, Mammano E, Liotta L, Petricoin E, Pierobon M. Protein pathway activation mapping of colorectal metastatic progression reveals metastasis-specific network alterations. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Mar; 30(3): 309-16.
- 40) Katayama M, Nakano H, Ishiuchi A, Wu W, Oshima R, Sakurai J, Nishikawa H, Yamaguchi S, Otsubo T. Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg Today*. 2006; 36(12): 1085-93.
- 41) Stang A, Keles H, Hentschke S, Seydewitz C, Keuchel M, Pohland C, Dahlke J, Weilert H, Wessling J, Malzfeldt E. Real-time ultrasonography-computed tomography fusion imaging for staging of hepatic metastatic involvement in patients with colorectal cancer: initial results from comparison to US seeing separate CT images and to multidetector-row CT alone. *Invest Radiol*. 2010 Aug; 45(8): 491-501.
- 42) Frankel TL, Gian RK, Jarnagin WR. Preoperative imaging for hepatic resection of colorectal cancer metastasis. *J Gastrointest Oncol*. 2012 Mar; 3(1):11-8.
- 43) Koh DM, Collins DJ, Wallace T, Chau I, Riddell AM. Combining diffusion-weighted MRI with Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI improves the detection of colorectal liver metastases. *Br J Radiol*. 2012 Jul; 85(1015): 980-9.
- 44) Eiber M, Fingerle AA, Brügel M, Gaa J, Rummeny EJ, Holzapfel K. Detection and classification of focal liver lesions in patients with colorectal cancer: retrospective comparison of diffusion-weighted MR imaging and multi-slice CT. *Eur J Radiol*. 2012 Apr; 81(4): 683-91.
- 45) Luc Soler<sup>1,2</sup>, Stephane Nicolau<sup>1</sup>, Patrick Pessaux<sup>1,2</sup>, Didier Mutter<sup>1,2</sup>, Jacques Marescaux<sup>1,2</sup>. Real-time 3D image reconstruction guidance in liver resection surgery. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3(2):73-81
- 46) Gobbi PG<sup>1</sup>, Rossi S, Comelli M, Ravetta V, Rosa LL, Brugnattelli S, Corbella F, Delfanti S, Abumalouh I, Dionigi P. The Prognosis of Patients with Liver Metastases from Colorectal Cancer still Depends on Anatomical Presentation more than on Treatments. *Curr Cancer Drug Targets*. 2015; 15 (6): 511-8.
- 47) Justin Guinney<sup>1,\*</sup>, Rodrigo Dienstmann<sup>1,2,\*</sup>, Xin Wang<sup>3,4,\*</sup>, Aurélien de Reyniès<sup>5,\*</sup>, Andreas Schlicker<sup>6,\*</sup>, Charlotte Sonesson<sup>7,\*</sup>, Laetitia Marisa<sup>5,\*</sup>, Paul Roepman<sup>8,\*</sup>, Gift Nyamundanda<sup>9,\*</sup>, Paolo Angelino<sup>7</sup>, Brian M. Bot<sup>1</sup>, Jeffrey S. Morris<sup>10</sup>, Iris M. Simon<sup>8</sup>, Sarah Gerster<sup>7</sup>, Evelyn Fessler<sup>3</sup>, Felipe de Sousa e Melo<sup>3</sup>, Edoardo Missiaglia<sup>7</sup>, Hena Ramay<sup>7</sup>, David Barras<sup>7</sup>, Krisztian Homicsko<sup>11</sup>, Dipen Maru<sup>10</sup>, Ganiraju C. Manyam<sup>10</sup>, Bradley Broom<sup>10</sup>, Valerie Boige<sup>12</sup>, Beatriz Perez-Villamil<sup>13</sup>, Ted Laderas<sup>1</sup>, Ramon Salazar<sup>14</sup>, Joe W. Gray<sup>15</sup>, Douglas Hanahan<sup>11</sup>, Josep Tabernero<sup>2</sup>, Rene Bernards<sup>6</sup>, Stephen H. Friend<sup>1</sup>, Pierre Laurent-Puig<sup>16</sup>, Jan Paul Medema<sup>3,§</sup>, Anguraj Sadanandam, Lodewyk Wessels<sup>6,§</sup>, Mauro Delorenzi<sup>7,17</sup>, Scott Kopetz<sup>10</sup>, Louis Vermeulen<sup>3</sup>, and Sabine Tejpar<sup>18</sup>. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat Med*. 2015 November; 21 (11): 1350-1356.

- 48) Fan NJ, Gao CF, Wang XL. Identification of Regional Lymph Node Involvement of Colorectal Cancer by Serum SELDI Proteomic Patterns. *Gastroenterol Res Pract.* 2011; 2011:784967.
- 49) Lencioni R, Crocetti L, Cioni D, Della Pina C, Bartolozzi C. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic colorectal metastases: technique, indications, results, and new promises. *Invest Radiol.* 2004 Nov; 39(11): 689-97.
- 50) Katharina Joechle, Christian Moser, Petra Ruemmele, Katharina M. Schmidt, Jens M. Werner, Edward K. Geissler, Hans J. Schlitt, Sven A. Lang. ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy) does not affect proliferation, apoptosis, or angiogenesis as compared to standard liver resection for colorectal liver metastases. *World J Surg Oncol.* 2017; 15: 57
- 51) Grundmann RT<sup>1</sup>, Hermanek P, Merkel S, Germer CT, Grundmann RT, Hauss J, Henne-Bruns D, Herfarth K, Hermanek P, Hopt UT, Junginger T, Klar E, Klempnauer J, Knapp WH, Kraus M, Lang H, Link KH, Löhe F, Merkel S, Oldhafer KJ, Raab HR, Rau HG, Reinacher-Schick A, Ricke J, Roder J, Schäfer AO, Schlitt HJ, Schön MR, Stippel D, Tannapfel A, Tatsch K, Vogl TJ; Arbeitsgruppe Workflow Diagnostik und Therapie von Lebermetastasen kolorektaler Karzinome. [Diagnosis and treatment of colorectal liver metastases - workflow]. *Zentralbl Chir.* 2008 Jun; 133 (3): 267-84.
- 52) Padmanabhan C<sup>1</sup>, Parikh A<sup>1</sup>. Perioperative chemotherapy for resectable colorectal hepatic metastases-What does the EORTC 40983 trial update mean? *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015 Feb; 4 (1):80-3.
- 53) Nordlinger B<sup>1</sup>, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Mauer M, Tanis E, Van Cutsem E, Scheithauer W, Gruenberger T; Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013 Nov; 14(12): 1208-15.
- 54) Adam R<sup>1</sup>, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D, Giacchetti S, Paule B, Kunstlinger F, Ghémard O, Levi F, Bismuth H. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg.* 2004 Oct; 240(4): 644-58
- 55) Gilles Mentha, MD<sup>1,4</sup>, Sylvain Terraz, MD<sup>2,4</sup>, Axel Andres, MD<sup>1</sup>, Christian Toso, MD, PhD<sup>1,4</sup>, Laura Rubbia-Brandt, MD, PhD<sup>3,4</sup>, Pietro Majno, MD, FRCS (Engl)<sup>1,4</sup>. Operative Management of Colorectal Liver Metastases. *Semin Liver Dis* 2013; 33: 262-272.
- 56) Brouquet A, Nordlinger B. Neoadjuvant and adjuvant therapy in relation to surgery for colorectal liver metastases. *Scand J Gastroenterol.* 2012 Mar; 47(3):286-95. Epub 2011 Dec 19.
- 57) Gallinger S, Biagi JJ, Fletcher GG, Nhan C, Ruo L, McLeod RS. Liver resection for colorectal cancer metastases. *Curr Oncol.* 2013 Jun; 20(3): e255-65.
- 58) Estrella JS, Othman ML, Taggart MW, Hamilton SR, Curley SA, Rashid A, Abraham SC. Intrahepatic Growth of Liver Metastases: Clinicopathologic Features, Prevalence, and Outcome. *Am J Surg Pathol.* 2013 Jun 20.
- 59) Kopetz S, Morris VK, Parikh N, Overman MJ, Jiang ZQ, Maru D, Elvin P, Gallick G<sup>1</sup>. Src activity is modulated by oxaliplatin and correlates with outcomes after hepatectomy for metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2014 Sep 10; 14: 660.
- 60) Viganò L, Karoui M, Ferrero A, Tayar C, Cherqui D, Capussotti L. Locally advanced mid/low rectal cancer with synchronous liver metastases. *World J Surg.* 2011 Dec; 35(12): 2788-95.

- 61) Kopetz S<sup>1</sup>, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, Grothey A, Vauthey JN, Nagorney DM, McWilliams RR. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 1; 27(22): 3677-83.
- 62) Hind D<sup>1</sup>, Tappenden P, Tumor I, Eggington S, Sutcliffe P, Ryan A. The use of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed for the treatment of advanced colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2008 May; 12 (15).
- 63) Shitara K, Yuki S, Yamazaki K, Naito Y, Fukushima H, Komatsu Y, Yasui H, Takano T, Muro K. Validation study of a prognostic classification in patients with metastatic colorectal cancer who received irinotecan-based second-line chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Apr; 139(4): 595-603.
- 64) Desot E, de Mestier L, Volet J, Delmas C, Garcia B, Geoffroy P, Abdelli N, Baule M, Dubroeuq O, Marquis E, Bouché O. Prognostic factors in patients with non resectable metastatic colorectal cancer in the era of targeted biotherapies: relevance of Köhne's risk classification. *Dig Liver Dis*. 2013 Apr; 45(4): 330-5.
- 65) Ishibashi K, Okada N, Tajima Y, Amano K, Hatano S, Kuwabara K, Sobajima J, Ishiguro T, Ohsawa T, Kumamoto K, Kumagai Y, Baba H, Tsuji Y, Haga N, Ishida H. [Predictive value of Köhne's index on the efficacy of FOLFIRI regimen in the treatment of unresectable liver metastasis of colorectal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2012 Nov; 39(12): 2182-4.
- 66) Grundmann RT. Current state of surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2011 Dec 27; 3(12): 183-96.
- 67) Feng Q<sup>1</sup>, Wei Y<sup>1</sup>, Zhu D<sup>1</sup>, Ye L<sup>1</sup>, Lin Q<sup>1</sup>, Li W<sup>1</sup>, Qin X<sup>1</sup>, Lyu M<sup>2</sup>, Xu J<sup>1</sup>. Timing of hepatectomy for resectable synchronous colorectal liver metastases: for whom simultaneous resection is more suitable—a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Aug 5; 9 (8).
- 68) Patrono D, Paraluppi G, Perino M, Palisi M, Migliaretti G, Berchiolla P, Romagnoli R, Salizzoni M. Posthepatectomy liver failure after simultaneous versus staged resection of colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *G Chir*. 2014 Mar-Apr; 35(3-4): 86-93.
- 69) Vibert E<sup>1</sup>, Pittau G<sup>2</sup>, Gelli M<sup>3</sup>, Cunha AS<sup>4</sup>, Jamot L<sup>5</sup>, Faivre J<sup>4</sup>, Castro Benitez C<sup>3</sup>, Castaing D<sup>4</sup>, Adam R<sup>2</sup>. Actual incidence and long-term consequences of posthepatectomy liver failure after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Surgery*. 2014 Jan; 155(1): 94-105
- 70) Rahbari NN<sup>1</sup>, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, Koch M, Makuuchi M, Dematteo RP, Christophi C, Banting S, Usatoff V, Nagino M, Maddern G, Hugh TJ, Vauthey JN, Greig P, Rees M, Yokoyama Y, Fan ST, Nimura Y, Figueras J, Capussotti L, Büchler MW, Weitz J. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*. 2011 May; 149(5): 713-24.
- 71) Nadalin S<sup>1</sup>, Capobianco I<sup>1</sup>, Li J<sup>2</sup>, Girotti P<sup>1</sup>, Königsrainer I<sup>1</sup>, Königsrainer A<sup>1</sup>. Indications and limits for associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS). Lessons Learned from 15 cases at a single centre. *Z Gastroenterol*. 2014 Jan; 52(1): 35-42.
- 72) Zhang GQ<sup>1</sup>, Zhang ZW<sup>1</sup>, Lau WY<sup>2</sup>, Chen XP<sup>3</sup>. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): a new strategy to increase resectability in liver surgery. *Int J Surg*. 2014; 12(5): 437-41
- 73) Golse N<sup>1</sup>, Bucur PO, Adam R, Castaing D, Sa Cunha A, Vibert E. New paradigms in post-hepatectomy liver failure. *J Gastrointest Surg*. 2013 Mar; 17(3): 593-605

- 74) Alvarez FA<sup>1</sup>, Ardiles V, de Santibañes M, Pekolj J, de Santibañes E. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy offers high oncological feasibility with adequate patient safety: a prospective study at a single center. *Ann Surg.* 2015 Apr;261(4):723-3.
- 75) Lin XJ<sup>1</sup>, Yang J<sup>1</sup>, Chen XB<sup>1</sup>, Zhang M<sup>1</sup>, Xu MQ<sup>2</sup>. The critical value of remnant liver volume-to-body weight ratio to estimate posthepatectomy liver failure in cirrhotic patients. *J Surg Res.* 2014 May 15; 188(2): 489-95.
- 76) Yaprak O<sup>1</sup>, Guler N, Altaca G, Dayangac M, Demirbas T, Akyildiz M, Ulusoy L, Tokat Y, Yuzer Y. Ratio of remnant to total liver volume or remnant to body weight: which one is more predictive on donor outcomes?. *HPB (Oxford).* 2012 Jul; 14(7): 476-82.
- 77) Truant S<sup>1</sup>, Oberlin O, Sergent G, Lebuffe G, Gambiez L, Ernst O, Pruvot FR. Remnant liver volume to body weight ratio > or =0.5%: A new cut-off to estimate postoperative risks after extended resection in noncirrhotic liver. *J Am Coll Surg.* 2007 Jan; 204(1): 22-33.
- 78) Ironside N<sup>1</sup>, Bell R<sup>2</sup>, Bartlett A<sup>3</sup>, McCall J<sup>4</sup>, Powell J<sup>5</sup>, Pandanaboyan. Systematic review of perioperative and survival outcomes of liver resections with and without preoperative portal vein embolization for colorectal metastases. *HPB (Oxford).* 2017 Apr 21. pii: S1365-182X(17)30529-4.
- 79) Asbun HJ, Tsao JI, Hughes KS. Resection of hepatic metastases from colorectal carcinoma. The registry data. *Cancer Treat Res.* 1994; 69:33-41.
- 80) Polignano FM, Quyn AJ, Sanjay P, Henderson NA, Tait IS. Totally laparoscopic strategies for the management of colorectal cancer with synchronous liver metastasis. *Surg Endosc.* 2012 Sep; 26(9): 2571-8.
- 81) Patrìti A, Ceccarelli G, Bartoli A, Spaziani A, Lapalorcia LM, Casciola L. Laparoscopic and robot-assisted one-stage resection of colorectal cancer with synchronous liver metastases: a pilot study. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009; 16(4): 450-7.
- 82) Qiu J, Chen S, Pankaj P, Wu H. Laparoscopic hepatectomy for hepatic colorectal metastases a retrospective comparative cohort analysis and literature review. *PLoS One.* 2013; 8 (3).
- 83) Kandil E, Noureldine SI, Saggi B, Buell JF. Robotic liver resection: initial experience with three-arm robotic and single-port robotic technique. *JLS.* 2013 Jan-Mar; 17(1): 56-62.
- 84) Lencioni R, Crocetti L, Pina MC, Cioni D. Percutaneous image-guided radiofrequency ablation of liver tumors. *Abdom Imaging.* 2009 Sep-Oct; 34(5): 547-56.
- 85) Gemoll T, Roblick U J, Auer G, Jornvall H, and Habermann J K. SELDI-TOF serum proteomics and colorectal cancer: A current overview. *Arch Fisiol Biochem,* 2010; 116 (4-5); 188-196.
- 86) Toyama Y, Ushigome T, Watanabe K, Kitamura H, Onda S, Saito R, Yoshida S, Kawahara H, Yanagisawa S, Yanaga K. Possibility of sandwiched liver surgery with molecular targeting drugs, cetuximab and bevacizumab on colon cancer liver metastases: a case report. *World J Surg Oncol.* 2012 Jun 29; 10:129.
- 87) Cabart M<sup>1</sup>, Frénel JS<sup>2</sup>, Campion L<sup>2</sup>, Ramée JF<sup>3</sup>, Dupuis O<sup>4</sup>, Senellart H<sup>2</sup>, Huret S<sup>2</sup>, Douillard JY<sup>2</sup>, Bennouna J<sup>2</sup>. KRAS mutation does not influence oxaliplatin or irinotecan efficacy, in association with bevacizumab, in first line treatment of metastatic colorectal cancer. *Bull Cancer.* 2016 Jun; 103(6): 541-51.
- 88) Abad A<sup>1</sup>, Massuti B, Antón A, Vega ME, Yuste AL, Marcuello E, Manzano JL, Alonso V, Carrato A, Martínez-Villacampa M, Tabernero J, Aranda E, Rivera F, Díaz-Rubio E; Spanish Cooperative Group for Digestive Tumor Therapy. Colorectal cancer metastasis resectability after treatment with the combination of oxaliplatin, irinotecan and 5-fluorouracil. Final results of a phase II study. *Acta Oncol.* 2008; 47(2): 286-92.



- 89) Arredondo J, Baixauli J, Beorlegui C, Arbea L, Rodríguez J, Sola JJ, Chopitea A, Hernández-Lizoáin JL. Prognosis factors for recurrence in patients with locally advanced rectal cancer preoperatively treated with chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy. (CCR no metastasis). *Dis Colon Rectum*. 2013 Apr; 56(4): 416-21.
- 90) Kobayashi H, Uetake H, Higuchi T, Enomoto M, Iida S, Ishikawa T, Ishiguro M, Kato S, Matsuyama T, Ono H, Yamauchi S, Masuda D, Sugihara K. [Repeated resections for originally unresectable liver metastasis from colorectal cancer after multiagent chemotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2011 No v; 38(12): 2301-3.
- 91) Yang ZY1, Wu XY, Huang YF, Di MY, Zheng DY, Chen JZ, Ding H, Mao C, Tang JL. Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cancer*. 2013 Oct 15; 133(8): 1914-25. Epub 2013 Jul 13.
- 92) Makino S, Murata K, Murakami M, Wada Y, Kato R, Nishigaki T, Owada Y, Okada K, Yanagisawa T, Okamura S, Ebisui C, Yokouchi H, Kinuta M, Nakagomi N, Tamai M. [Liver damage detected after a hepatectomy for liver metastasis after 12 courses of mFOLFOX6 therapy as an adjuvant chemotherapy for colorectal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2012 Nov; 39(12): 2222-4.
- 93) Grundmann RT, Hermanek P, Merkel S, Germer CT, Grundmann RT, Hauss J, Henne-Bruns D, Herfarth K, Hermanek P, Hopt UT, Junginger T, Klar E, Klempnauer J, Knapp WH, Kraus M, Lang H, Link KH, Löhe F, Merkel S, Oldhafer KJ, Raab HR, Rau HG, Reinacher-Schick A, Ricke J, Roder J, Schäfer AO, Schlitt HJ, Schön MR, Stippel D, Tannapfel A, Tatsch K, Vogl TJ; [Diagnosis and treatment of colorectal liver metastases - workflow]. *Zentralbl Chir*. 2008 Jun; 133(3): 267-84.
- 94) Hopt UT, Drognitz O, Neeff H. [Timing of resection in patients with colorectal carcinoma and synchronous liver metastases]. *Zentralbl Chir*. 2009 Sep; 134(5): 425-9.
- 95) Hamada T, Taniguchi E, Ohta K, Yoshikawa M, Yamagami Y, Ohashi S. [A case of recurrent colon cancer involved in multiple organs maintaining complete response over the long-term after chemotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2013 Feb; 40(2): 249-53.
- 96) Feng QY1, Wei Y1, Chen JW1, Chang WJ1, Ye LC1, Zhu DX1, Xu JM1. Anti-EGFR and anti-VEGF agents: important targeted therapies of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 21; 20 (15): 4263-75.
- 97) García-Foncillas J, Díaz-Rubio E. Progress in metastatic colorectal cancer: growing role of cetuximab to optimize clinical outcome.) *Clin Transl Oncol*. 2010 Aug;12(8):533-42.
- 98) Helena Verdaguer, Josep Tabernero and Teresa Macarulla. Ramucirumab in metastatic colorectal cancer: evidence to date and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol* 2016, Vol. 8(3) 230–242.
- 99) Dienstmann R1, Salazar R1, Tabernero J1. Overcoming Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015: e149-56.
- 100) Yen LC, Uen YH, Wu DC, Lu CY, Yu FJ, Wu IC, Lin SR, Wang JY. Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Ann Surg*. 2010 Feb; 251(2): 254-60.
- 101) Yen LC, Yeh YS, Chen CW, Wang HM, Tsai HL, Lu CY, Chang YT, Chu KS, Lin SR, Wang JY. Detection of KRAS oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1; 15(13): 4508-13.
- 102) Stein A, Schmoll HJ. Systemic treatment of liver metastases from colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2013 May; 5(3): 193-203.

- 103) Nakatake R, Kaibori M, Ishizaki M, Iwamoto S, Matsui K, Iwai A, Tsuda T, Matsushima H, Yoshioka K, Kwon AH. [A case of a colon cancer patient with liver metastasis subjected to hepatectomy after achieving radiographic complete response with preoperative chemotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2012 Nov; 39(12): 2231-3.
- 104) Michl M<sup>1</sup>, Stintzing S<sup>2</sup>, Fischer von Weikersthal L<sup>3</sup>, Decker T<sup>4</sup>, Kiani A<sup>5</sup>, Vehling-Kaiser U<sup>6</sup>, Al-Batran SE<sup>7</sup>, Heintges T<sup>8</sup>, Lerchenmueller C<sup>9</sup>, Kahl C<sup>10</sup>, Seipelt G<sup>11</sup>, Kullmann F<sup>12</sup>, Stauch M<sup>13</sup>, Scheithauer W<sup>14</sup>, Hielscher J<sup>15</sup>, Scholz M<sup>16</sup>, Mueller S<sup>17</sup>, Lerch MM<sup>18</sup>, Modest DP<sup>2</sup>, Kirchner T<sup>19</sup>, Jung A<sup>19</sup>, Heinemann V<sup>2</sup>; FIRE-3 Study Group. CEA response is associated with tumor response and survival in patients with KRAS exon 2 wild-type and extended RAS wild-type metastatic colorectal cancer receiving first-line FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab (FIRE-3 trial). *Ann Oncol*. 2016 Aug; 27(8):1565-72.
- 105) Hiroshi Osawa Response to regorafenib at an initial dose of 120 mg as salvage therapy for metastatic colorectal cancer. *Mol Clin Oncol*. 2017 Mar; 6(3):365-372. doi: 10.3892/mco.2017.1145. Epub 2017 Jan 31.
- 106) Douillard JY<sup>1</sup>, Siena S<sup>2</sup>, Peeters M<sup>3</sup>, Koukakis R<sup>4</sup>, Terwey JH<sup>5</sup>, Tabernero J<sup>6</sup>. Impact of early tumour shrinkage and resection on outcomes in patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2015 Jul; 51(10): 1231-42.
- 107) Cuesta R, Gupta M, Schneider RJ. The regulation of protein synthesis in cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2009; 90: 255-92.
- 108) Martí J, Fuster J, Estanyol JM, Fernández F, Deulofeu R, Ferrer J, Pelegrina A, Reyes A, Fondevila C, García-Valdecasas JC. Clinical and prognostic usefulness of serum proteomic profile in hepatic colorectal metastases: a pilot prospective study. *Clin Transl Oncol* 2013 Jan 30.
- 109) Martí J, Modolo MM, Fuster J, Comas J, Cosa R, Ferrer J, Molina V, Romero J, Fondevila C, Charco R, García- Valdecasas JC. Prognostic factors and time-related changes influence results of colorectal liver metastases surgical treatment. A single-center analysis. *World J Gastroenterol* 2009; 15(21): 2587-2594.
- 110) Martí J, Fuster J, Solà AM, Hotter G, Molina R, Pelegrina A, Ferrer J, Deulofeu R, Fondevila C, García-Valdecasas JC. Prognostic value of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in metastatic and non-metastatic colorectal cancer. *World J Surg* 2013. May; 37 (5): 1013-9.
- 111) Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet*. 2013; 14(1):35-48.
- 112) Puntmann VO<sup>1</sup>, Peker E<sup>1</sup>, Chandrashekhara Y<sup>1</sup>, Nagel E<sup>2</sup>. T1 Mapping in Characterizing Myocardial Disease: A Comprehensive Review. *Puntmann Circ Res*. 2016 Jul 8; 119(2):277-99.
- 113) Kargozaran H, Kehlenberg M, Kahatri VP, The implications of colorectal cancer molecular biology in clinical practice. *Surg Oncol Clin N Am*. 2008; 17(2): 341-355.
- 114) Sabine Tejpar, The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Volume 21, Issue 6, Pages 1071-1087, December 2007.
- 115) Martí J, Fuster J, Hotter G, Solà AM, Deulofeu R, Modolo MM, Loera MA, Ferrer J, Fondevila C, García-Valdecasas JC. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with colorectal liver metastases: preliminary results of an exploratory prospective study. *Int J Biol Markers*. 2010 Jan-Mar; 25(1):21-6.
- 116) González-González M, Garcia JG, Montero JA, Fernandez LM, Bengoechea O, Muñoz OB, Orfao A, Sayagues JM, Fuentes M. Genomics and proteomics approaches for biomarker discovery in sporadic colorectal cancer with metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2013 Jan-Feb; 10 (1):19-25.

- 117) Zhu D<sup>1</sup>, Zhong Y, Wu H, Ye L, Wang J, Li Y, Wei Y, Ren L, Xu B, Xu J, Qin X. Predicting metachronous liver metastasis from colorectal cancer using serum proteomic fingerprinting. *J Surg Res*. 2013 Oct; 184 (2): 861-6.
- 118) Spijel Fulgencio, Roa Juan Carlos. Surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI): Tecnología proteómica y su aplicación en Oncología. *Med Clin (Barc)* 2008; 131 (8), 312-317.
- 119) Dahabreh IJ, Terasawa T, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2011 Jan 4; 154(1):37-49.
- 120) Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Oct 7;101(19):1308-24.
- 121) László L. Predictive and prognostic factors in the complex treatment of patients with colorectal cancer. *Magy Onkol*. 2010 Dec; 54 (4): 383-94.
- 122) Hoyle M, Crathorne L, Peters J, Jones-Hughes T, Cooper C, Napier M, Tappenden P, Hyde C. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of cetuximab (mono- or combination chemotherapy), bevacizumab (combination with non-oxaliplatin chemotherapy) and panitumumab (monotherapy) for the treatment of metastatic colorectal cancer after first-line chemotherapy (review of technology appraisal No.150 and part review of technology appraisal No. 118): a systematic review and economic model. *Health Technol Assess*. 2013 Apr; 17(14): 1-237.
- 123) Vijayaraghavan A<sup>1</sup>, Efrusy MB, Göke B, Kirchner T, Santas CC, Goldberg RM. Cost-effectiveness of KRAS testing in metastatic colorectal cancer patients in the United States and Germany. *Int J Cancer*. 2012 Jul 15; 131(2): 438-45.
- 124) Hoyle M, Peters J, Crathorne L, Jones-Hughes T, Cooper C, Napier M, Hyde C. Cost-effectiveness of cetuximab, cetuximab plus irinotecan, and panitumumab for third and further lines of treatment for KRAS wild-type patients with metastatic colorectal cancer. *Value Health*. 2013 Mar-Apr; 16 (2): 288-96.
- 125) Barone C<sup>1</sup>, Pinto C<sup>2</sup>, Normanno N<sup>3</sup>, Capussotti L<sup>4</sup>, Cognetti F<sup>5</sup>, Falcone A<sup>6</sup>, Mantovani L<sup>7</sup>. KRAS early testing: consensus initiative and cost-effectiveness evaluation for metastatic colorectal patients in an Italian setting. *PLoS One*. 2014 Jan 20; 9(1): e85897.
- 126) Pentheroudakis G<sup>1</sup>, Kotoula V, De Roock W, Kouvatsos G, Papakostas P, Makatsoris T, Papamichael D, Xanthakis I, Sgouros J, Televantou D, Kafiri G, Tsamandas AC, Razis E, Galani E, Bafaloukos D, Efstratiou I, Bompolaki I, Pectasides D, Pavlidis N, Tejpar S, Fountzilas G. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer*. 2013 Feb 2; 13: 49.
- 127) Saridaki Z<sup>1</sup>, Tzardi M<sup>2</sup>, Sfakianaki M<sup>3</sup>, Papadaki C<sup>3</sup>, Voutsina A<sup>3</sup>, Kalykaki A<sup>3</sup>, Messaritakis I<sup>3</sup>, Mpananis K<sup>3</sup>, Mavroudis D<sup>1</sup>, Stathopoulos E<sup>2</sup>, Georgoulas V<sup>1</sup>, Souglakos J<sup>1</sup>. BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: correlations with clinical characteristics, and its impact on patients' outcome. *PLoS One*. 2013 Dec 18; 8(12).
- 128) Sinha R, Hussain S, Mehrotra R, Kumar RS, Kumar K, Pande P, Doval DC, Basir SF, Bharadwaj M. Kras gene mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT gene promoter hypermethylation: indicators of tumor staging and metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in Indian population. *PLoS One*. 2013; 8 (4).
- 129) Gordon M, El-Kalla M, Zhao Y, Fiteih Y, Law J, Volodko N, Mohamed A, El-Kadi AO, Liu L, Odenbach J, Thiesen A, Onyskiw C, Ghazaleh HA, Park J, Lee SB, Yu VC, Fernandez-Patron C, Alexander RT, Wine E, Baksh S. The tumor suppressor gene, RASSF1A, is essential for protection against inflammation induced injury. *PLoS One*. 2013 Oct 16; 8 (10).

- 130) Wang Z, Yuan X, Jiao N, Zhu H, Zhang Y, Tong J. CDH13 and FLBN3 gene methylation are associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res.* 2012 Apr; 18 (2):263-70.
- 131) Nilsson TK, Löf-Öhlin ZM, Sun XF. DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Int J Oncol.* 2013 Jan; 42 (1):127-33.
- 132) Min BS<sup>1</sup>, Kim NK, Jeong HC, Chung HC. High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. *Oncol Lett.* 2012 Jul; 4 (1):123-130.
- 133) Wu WJ, Hu KS, Wang DS, Zeng ZL, Zhang DS, Chen DL, Bai L, Xu RH. CDC20 overexpression predicts a poor prognosis for patients with colorectal cancer. *J Transl Med.* 2013 Jun 10; 11: 142.
- 134) Shen F, Li J, Cai W, Zhu G, Gu W, Jia L, Xu B. GATA6 predicts prognosis and hepatic metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2013 Jun 19.
- 135) Chu XY, Zhu ZM, Chen LB, Wang JH, Su QS, Yang JR, Lin Y, Xue LJ, Liu XB, Mo XB. FOXM1 expression correlates with tumor invasion and a poor prog-nosis of colorectal cancer. *Acta Histochem.* 2012 Dec; 114(8): 755-62.
- 136) Chu XY, Chen LB, Wang JH, Su QS, Yang JR, Lin Y, Xue LJ, Liu XB, Mo XB. Overexpression of survivin is correlated with increased invasion and metastasis of colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2012 May; 105(6): 520-8.
- 137) Wang D, Xu MR, Wang T, Li T, Zhu Jw. MTSS1 overexpression correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2011 Jul; 15(7): 1205-12.
- 138) Jin-Song Y, Zhao-Xia W, Cheng-Yu L, Xiao-Di L, Ming S, Yuan-Yuan G, Wei D. Prognostic significance of Bcl-xL gene expression in human colorectal cancer. *Acta Histochem.* 2011 Dec; 113 (8): 810-4.
- 139) Zhang GJ, Zhou T, Tian HP, Liu ZL, Xia SS. High expression of ZEB1 correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2013 Feb; 5 (2): 564-568.
- 140) Xiao X, Wang L, Wei P, Chi Y, Li D, Wang Q, Ni S, Tan C, Sheng W, Sun M, Zhou X, Du X. Role of MUC20 overexpression as a predictor of recurrence and poor outcome in colorectal cancer. *J Transl Med.* 2013 Jun 20; 11(1): 151.
- 141) Fang XF, Hou ZB, Dai XZ, Chen C, Ge J, Shen H, Li XF, Yu LK, Yuan Y. Special AT-rich sequence-binding protein 1 promotes cell growth and metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2013 Apr 21; 19(15): 2331-9.
- 142) Georges R, Bergmann F, Hamdi H, Zepp M, Eyol E, Hielscher T, Berger MR, Adwan H. Sequential biphasic changes in claudin1 and claudin4 expression are correlated to colorectal cancer progression and liver metastasis. *J Cell Mol Med.* 2012 Feb; 16(2): 260-72.
- 143) Li D, Yan D, Tang H, Zhou C, Fan J, Li S, Wang X, Xia J, Huang F, Qiu G, Peng Z. IMP3 is a novel prognostic marker that correlates with colon cancer progression and pathogenesis. *Ann Surg Oncol.* 2009 Dec; 16(12): 3499-506.
- 144) Sase T, Suzuki T, Miura K, Shiiba K, Sato I, Nakamura Y, Takagi K, Onodera Y, Miki Y, Watanabe M, Ishida K, Ohnuma S, Sasaki H, Sato R, Karasawa H, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Sasano H. Runt-related transcription factor 2 in human colon carcinoma: a potent prognostic factor associated with estrogen receptor. *Int J Cancer.* 2012 Nov 15; 131 (10): 2284-93.
- 145) Murakami T, Kawada K, Iwamoto M, Akagami M, Hida K, Nakanishi Y, Kanda K, Kawada M, Seno H, Taketo MM, Sakai Y. The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis. *Nt J Cancer.* 2013 Jan 15; 132(2): 276-87.

- 146) Ding YL, Wang QS, Zhao WM, Xiang L., Expression of smoothed protein in colon cancer and its prognostic value for postoperative liver metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; Vol13 (8):4001-5.
- 147) Li D, Peng X, Yan D, Tang H, Huang F, Yang Y, Peng Z. Msi-1 is a predictor of survival and a novel therapeutic target in colon cancer. *Ann Surg Oncol.* 2011 Jul;18(7):2074-83. Epub 2011 Mar 26.
- 148) Shen YM, Arbman G, Sandström P, Gullstrand P, Wei YQ, Zhang H, Rosell J, Olsson B, Peng F, Yang HS, Wang CT, Sun XF. Novel gene hBiot2 is an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Oncol Rep.* 2012 Feb;27(2):376-82.
- 149) Wu WJ, Hu KS, Chen DL, Zeng ZL, Luo HY, Wang F, Wang DS, Wang ZQ, He F, Xu RH. Prognostic relevance of BRD7 expression in colorectal carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 2013 Feb;43(2):131-40.
- 150) Ciordia S, de Los Ríos V, Albar JP. Contributions of advanced proteomics technologies to cancer diagnosis. *Clin Transl Oncol.* 2006 Aug; 8(8):566-80.
- 151) Coffey DS<sup>1</sup>. Nuclear matrix proteins as proteomic markers of preneoplastic and cancer lesions: commentary re: G. Brunagel et al., nuclear matrix protein alterations associated with colon cancer metastasis to the liver. *Clin Cancer Res.* 2002 Oct; 8(10): 3031-33.
- 152) Santini AC<sup>1</sup>, Giovane G<sup>2</sup>, Auletta A<sup>3</sup>, Di Carlo A<sup>4</sup>, Fiorelli A<sup>1</sup>, Cito L<sup>5</sup>, Astarita C<sup>6</sup>, Giordano A<sup>6,7</sup>, Alfano R<sup>8</sup>, Feola A<sup>3,9</sup>, Di Domenico M<sup>3,6</sup>. Translational Research and Plasma Proteomic in Cancer. *J Cell Biochem.* 2015 Oct 19.
- 153) Pinazo-Durán MD. Genetics, and something else. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2012 Feb; 87(2): 35-7.
- 154) Caballero-Villarraso J<sup>1</sup>, Márquez-Calderón S, Villegas-Portero R. Applications of proteomic techniques in clinical practice: present situation and perspectives. *Rev Clin Esp.* 2007 Jul-Aug; 207(7): 344-7
- 155) Bertuzzi M<sup>1</sup>, Marelli C<sup>2</sup>, Bagnati R<sup>3</sup>, Colombi A<sup>4</sup>, Fanelli R<sup>5</sup>, Saieva C<sup>6</sup>, Ceroti M<sup>7</sup>, Bendinelli B<sup>8</sup>, Caini S<sup>9</sup>, Airoidi L<sup>10</sup>, Palli D<sup>11</sup>. Plasma clusterin as a candidate pre-diagnosis marker of colorectal cancer risk in the Florence cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition: a pilot study. *BMC Cancer.* 2015 Feb 14; 15: 56.
- 156) Qi H<sup>1</sup>, Lou M, Chen Y, Liu X, Chen N, Shan J, Ling Z, Shen J, Zhu L, Yen Y, Zheng S, Shao J. Non-enzymatic action of RRM1 protein upregulates PTEN leading to inhibition of colorectal cancer metastasis. *Tumour Biol.* 2015 Jun;36(6):4833-42.
- 157) Leman ES<sup>1</sup>, Getzenberg RH. Nuclear structure as a source of cancer specific biomarkers. *J Cell Biochem.* 2008 Aug 15; 104(6): 1988-93.
- 158) Chiang SF<sup>1</sup>, Kan CY<sup>2</sup>, Hsiao YC<sup>3</sup>, Tang R<sup>4</sup>, Hsieh LL<sup>5</sup>, Chiang JM<sup>6</sup>, Tsai WS<sup>6</sup>, Yeh CY<sup>6</sup>, Hsieh PS<sup>6</sup>, Liang Y<sup>7</sup>, Chen JS<sup>6</sup>, Yu JS<sup>2</sup>. Bone Marrow Stromal Antigen 2 Is a Novel Plasma Biomarker and Prognosticator for Colorectal Carcinoma: A Secretome-Based Verification Study. *Dis Markers.* 2015; 2015: 874054
- 159) Bell RJ<sup>1</sup>, Rube HT<sup>2</sup>, Kreig A<sup>3</sup>, Mancini A<sup>4</sup>, Fouse SD<sup>4</sup>, Nagarajan RP<sup>4</sup>, Choi S<sup>5</sup>, Hong C<sup>4</sup>, He D<sup>4</sup>, Pekmezci M<sup>6</sup>, Wiencke JK<sup>7</sup>, Wrensch MR<sup>7</sup>, Chang SM<sup>4</sup>, Walsh KM<sup>8</sup>, Myong S<sup>3</sup>, Song JS<sup>9</sup>, Costello JF<sup>10</sup>. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science.* 2015 May 29; 348(6238): 1036-9.
- 160) De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, Santini D, Tonini G, Cappuzzo F, Frattini M, Molinari F, Saletti P, De Dosso S, Martini M, Bardelli A, Siena S, Sartore-Bianchi A, Tabernero J, Macarulla T, Di Fiore F, Gangloff AO, Ciardiello F, Pfeiffer P, Qvortrup C, Hansen TP, Van Cutsem E, Piessevaux H, Lambrechts D, Delorenzi M, Tejpar S. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory

- metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010 Aug;11(8):753-62.
- 161) Pando V, Batista C, Proteomica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotechnologia Vol 14, CS3.*
- 162) Guo Y, Fu Z, Van Eyk JE. A proteomic primer for the clinician. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 9-17.
- 163) McLeod HL, Murray GI; Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* (1999); Vol 79 (2): 191-203.
- 164) Schee K, Fodstad Ø, Flatmark K; MicroRNAs as biomarkers in colorectal cancer. *Am J Pathol, Oct2010; Vol 177, N° 4: 1592-1599.*
- 165) Carpenter B, McKay M, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C, et al.; Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly. *Br J Cancer* (2006); Vol 95, 921-927.
- 166) Meding S, Nitsche U, Balluff B, Elsner M, Rauser S, Schöne C, Nipp M, Maak M, Feith M, Ebert MP, Friess H, Langer R, Höfler H, Zitzelsberger H, Rosenberg R, Walch A. Tumor classification of six common cancer types based on proteomic profiling by MALDI imaging. *J Proteome Res.* 2012 Mar 2; 11(3): 1996-2003.
- 167) Bakry R, Rainer M, Huck CW, Bonn GK. Protein profiling for cancer biomarker discovery using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and infrared imaging: a review. *Anal Chim Acta.* 2011 Mar 25; 690(1): 26-34.
- 168) Lu HB, Zhou JH, Ma YY, Lu HL, Tang YL, Zhang QY, Zhao CH. Five serum proteins identified using SELDI-TOF-MS as potential biomarkers of gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2010 Apr; 40(4): 336-42.
- 169) Krasnov GS, Oparina NIu, Khankin SL, Colorectal cancer 2D-proteomics: identification of altered protein expression. *Mol Biol (Mosk).* 2009 Mar-Apr; Vol 43(2):348-56.
- 170) Fung ET. A recipe for proteomics diagnostic test development: the OVA1 test, from biomarker discovery to FDA clearance. *Clin Chem.* 2010; 56(2):327-9
- 171) Li Y, Wu J, Zhang W, Zhang N, Guo H. Identification of serum CCL15 in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2013; 108(1):99-106.
- 172) Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, Pessi MA, Prochilo T, Quadri A, Gatta G, de Braud F, Wils J. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010; 74(2):106-33.
- 173) O'Dwyer D, Ralton LD, O'Shea A, Murray GI; The proteomics of Colorectal cancer: Identification of a Protein Signature Associated with Prognosis. Department of pathology, University of Aberdeen, United Kingdom. *PLoS ONE* November 2011; Vol 6 (11).
- 174) Fang YJ, Lu ZN, Wang GQ; Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *Int J. Colorectal Dis.* Aug. 2009; Vol 24 (8) 875- 884.
- 175) Timo Gemoll, Uwe Johannes Roblick, Gert Auer, Hans Jornvall, and Jens Karsten Haber-mann. SELDI-TOF serum proteomics and colorectal cancer: A current overview. *Arch of Fisiol Biochem,* 2010; Vol 116 (4-5); 188-196.
- 176) Singh K, Singh B, Rao J. Proteomics Research: Technologies Involved In Evolution – A Review. *JDMS* 2012; 1(4): 01-09.
- 177) Li C, Xiao Z, Chen Z, Zhang X, Li J, Wu X, Li X, Yi H, Li M, Zhu G, Liang S. Proteome analysis of human lung squamous carcinoma. *Proteomics* 2006; 6(2):547-58.

- 178) Devarajan P, Ross GF. SELDI Technology for Identification of Protein Biomarkers. *Methods in Pharmacology and toxicology: Biomarker Methods in drugs discovery and developments* (2007); 251- 271.
- 179) Haleen j, Issaq, Timothy D, Veenestra, Thomas, Conrads, Donna Felschow. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and Biomarker identification. *Biochemical and Biophysical Research communications* 292, 587-592; 2002.
- 180) Liu C. *The Application of SELDI-TOF-MS in Clinical Diagnosis of cancers*. J Biomed Biotechnol; 2011
- 181) Søreide K, Nedrebø BS, Knapp JC, Glomsaker TB, Søreide JA, Kørner H. Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol* (2009); Vol 18: 31–50.
- 182) Kandoth C1, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MD, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013 Oct 17; 502 (7471): 333-9
- 183) FDA. FDA clears a test for ovarian cancer: Test can help identify potential malignancies, guide surgical decisions. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm182057>.
- 184) Ralton LD, Murray GI. Biomarkers for colorectal cancer: Identification through proteomics. *Curr Proteomics* 2010; 7(3): 212–221 (10).
- 185) Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, Kovar CL, Lewis LR, Morgan MB, Newsham IF, Reid JG, Santibanez J, Shinbrot E, Trevino LR, Wu YQ, Wang M, Gunaratne P, Donehower LA, Creighton CJ, Wheeler DA, Gibbs RA, Lawrence MS, Voet D, Jing R, and others. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407): 330-7.
- 186) King AJ, Breen DJ. Understanding the current status of image-guided ablation for metastatic colorectal disease. *Abdom Imaging*. 2013 Jun 14.
- 187) Brenner H<sup>1</sup>, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2013 Nov 8. pii: S0140-6736(13)61649-9.
- 188) Shi YJ, Zhao Y, Xu JM, Lai YH, Yu XZ, Zhong YS, Wei Y, Ren L, Zhu DX, Liu YK, Niu WX, Qin XY. Application of SELDI-TOF-MS in detection of liver metastasis from colorectal cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2008; 30(12): 910-3.
- 189) Casagrande M, Cremolini C, Loupakis F, Aprile G. A perspective on the current management of advanced colorectal cancer. *Future Oncol*. 2013 Nov; 9(11):1687-91.
- 190) Sugarbaker PH. Colorectal cancer metastases: a surgical perspective. *Surg Oncol Clin N Am*. 2013 Apr; 22(2):289-98.
- 191) Godman B<sup>1</sup>, Finlayson AE, Cheema PK, Zebedin-Brandl E, Gutiérrez-Ibarluzea I, Jones J, Malmström RE, Asola E, Baumgärtel C, Bennie M, Bishop I, Bucsics A, Campbell S, Diogene E, Ferrario A, Fürst J, Garuoliene K, Gomes M, Harris K, Haycox A, Herholz H, Hviding K, Jan S, Kalaba M, Kvalheim C, Laius O, Lööv SA, Malinowska K, Martin A, McCullagh L, Nilsson F, Paterson K, Schwabe U, Selke G, Sermet C, Simoens S, Tomek D, Vlahovic-Palcevski V, Voncina L, Wladysiuk M, van Woerkom M, Wong-Rieger D, Zarc C, Ali R, Gustafsson LL. Personalizing health care: feasibility and future implications. *BMC Med*. 2013 Aug 13; 11:179
- 192) Kalia M. Personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism*. 2013 Jan; 62 Suppl 1:S11-4.
- 193) Németh G, Jelinek I. [New directions in biomarker research, drug development and personalized medicine]. *Magy Onkol*. 2013 Mar; 57(1):5-10.

- 194) Nasr Z, Pelletier J. Tumor progression and metastasis: role of translational deregulation. *Anticancer Res.* 2012 Aug; 32(8): 3077-84.
- 195) Yeh CY, Hsieh PS, Chiang JM, Lai CC, Chen JS, Wang JY, Hung HY. Preoperative carcinoembryonic antigen elevation in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2011 Jul-Aug; 58 (109): 1171-6.
- 196) Ma CJ, Hsieh JS, Wang WM, Su YC, Huang CJ, Huang TJ, Wang JY. Multivariate analysis of prognostic determinants for colorectal cancer patients with high preoperative serum CEA levels: prognostic value of postoperative serum CEA levels. *Kaohsiung J Med Sci.* 2006 Dec; 22(12): 604-9.
- 197) Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010 Apr; 10(4):254-66.
- 198) De Wit M<sup>1</sup>, Fijneman RJ, Verheul HM, Meijer GA, Jimenez CR Proteomics in colorectal cancer translational research: biomarker discovery for clinical applications. *Clin Biochem.* 2013 Apr; 46(6): 466-79.
- 199) Kobayashi H, Kotake K, Sugihara K. Outcomes of surgery without HIPEC for synchronous peritoneal metastasis from colorectal cancer: data from a multicenter registry. *Nt J Clin Oncol.* 2012 Dec 13.
- 200) Van Cutsem E1, Cervantes A2, Nordlinger B3, Arnold D4; ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014 Sep; 25 Suppl 3.