



MÁSTER
UNIVERSITARIO EN
INVESTIGACIÓN
Y MEDICINA
CLÍNICA



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título

IMPLICACIÓN DE LA BAJA EXPRESIÓN DE
CDX2 EN PRONÓSTICO DEL CÁNCER
COLORRECTAL METASTÁSICO

Alumno: JOSE RAMÓN RODRIGUEZ MOWBRAY.

(Firma alumno aquí)

Tutor: FRACES GUARINOS, RUBÉN.

(Firma tutor aquí)

Curso: 2017-2018

ÍNDICE:

○ RESUMEN / PALABRAS CLAVE -----	2
○ ABSTRACT / KEY WORDS -----	3
○ INTRODUCCIÓN. ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN --	4-5
○ HIPÓTESIS -----	6
○ OBJETIVOS -----	6
○ METODOLOGÍA -----	7
▪ Diseño -----	7
▪ Ámbito del estudio -----	7
▪ Sujetos del estudio-----	7
▪ Estudios inmunohistoquímico y molecular-----	8
▪ Variables del estudio-----	9
▪ Recogida de datos, plan de trabajo, recursos humanos y materiales -----	9-11
▪ Tamaño muestral y análisis de datos -----	11
▪ Dificultades y limitaciones -----	12
○ RESULTADOS -----	12-14
○ DISCUSIÓN-----	14-15
○ CONCLUSIONES-----	15
○ ANEXOS, TABLAS Y FIGURAS -----	16-28
○ BIBLIOGRAFÍA-----	29-30

1. RESUMEN

OBJETIVOS: El objetivo del estudio es evaluar cual es la implicación de la baja expresión de CDX2 en las biopsias de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico (CCRM) y su implicación en el pronóstico de estos enfermos, además de su relación con otras variables.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se trata de un estudio de cohortes retrospectivo de muestras de pacientes con carcinoma colorrectal metastásico diagnosticados entre el 1 de enero del 2010 a diciembre del 2013. El ámbito de estudio es el Hospital Infanta Cristina de Badajoz, en total se han recogido 82 muestras de las biopsias de los enfermos. Todas ellas procedían del tumor primario (bien por endoscopia o de la pieza quirúrgica) y para cada paciente se determinó el tiempo de supervivencia como el tiempo en meses que transcurre entre la fecha del diagnóstico anatomopatológico y el fallecimiento en el caso no censurado, o la fecha fin del estudio en el caso censurado. La fecha de fin de estudio fue el 30 de Diciembre del 2017. Para la expresión de CDX2 se ha utilizado un sistema automatizado (Bond III, Leica) además se han analizado otros factores como las tres mutaciones puntuales del codón 600 del gen BRAF: V600E, V600K y V600D mediante técnicas de PCR a tiempo real ,el grado histológico y la lateralidad del tumor primario. El análisis estadístico se ha realizado con el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 22.

PALABRAS CLAVE: Cáncer colorrectal metastásico, baja expresión de CDX2, pronóstico, supervivencia global, factores moleculares.

2. ABSTRACT

OBJECTIVES: This study has been designed in order to evaluate the relationship between the lack expression of CDX2 in the biopsy of colorectal cancer and the overall survival in patients with colorectal metastatic cancer and also the relationship with another variables.

MATERIALS AND METHODS: This is a single-center, retrospective cohorts study. We have collected samples of patients that have been diagnosed with colorectal metastatic cancer from 1st of January 2010 to 31th of December 2013 . The study area was the Infanta Cristina Hospital in Badajoz. It has been collected 82 samples and all of them belongs to the primary tumor (from colonoscopy or surgical remove), each patient has calculated overall survival since the anatomopathological diagnosis to the death, in case that the data hasn't been censored, or at the end of the study if it has been censored. The end of the study was in 30 th of December 2017. For the CDX2 expression we have used the automated system (Bond III, Leica), and also we have analyzed the three punctual mutation of BRAF: V600E, V600K, V600D with PCR real time, histological grade and sidedness of the primary tumor. We have analyzed the data with the IBM SPSS Statistics version 22.

KEYWORDS: Metastatic colorectal cancer, CDX2 lack expression, prognosis, overall survival, molecular factors

3. INTRODUCCIÓN. ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tumor en incidencia en el varón y el segundo en la mujer, siendo el más frecuente si no hacemos distinción de sexos, ocupando el 15% del total de los tumores (1) y además es la segunda causa de muerte por cáncer en España.

El tratamiento se basa en la cirugía para los estadios I a III, pero aún así existen enfermos en estos estadios que desarrollarán metástasis a lo largo de su vida (aproximadamente un 40-50%), éstos junto a los enfermos que se diagnostican con enfermedad metastásica desde el inicio (otro 25%) supone que más de un 50 % de los pacientes se pueden encontrar en este escenario(2) , alcanzando supervivencias a los 5 años de aproximadamente un 10%(3).

En los pacientes que se diagnostican en enfermedad avanzada, supone un reto el identificar factores pronósticos que puedan dirigirnos en los tratamientos que se deben ofrecer y comprobar si estos factores pronósticos pueden modificar la estrategia en los pacientes también en estadios más precoces de la enfermedad.

La supervivencia de los enfermos definida por otros parámetros independientes de los clínicos está siendo motivo de investigación en los últimos años, desde el punto de vista molecular se ha avanzado en el desarrollo de diferentes patrones que condicionan el pronóstico de estos pacientes(4) y deben participar en la toma de decisiones(5).

Hay suficiente evidencia de la implicación de la expresión de CDX2 en estadios precoces de la enfermedad(6–9) pero no tanta en la enfermedad metastásica (10). En nuestro estudio se ha estudiado cual es la implicación de la baja expresión de CDX2 en cuanto al peor pronóstico de estos enfermos y así determinar en ensayos posteriores si este grupo se podría beneficiar de tratamientos más agresivos como viene reflejado ya en algunas guías en los pacientes que presentan la mutación de BRAF(11) .

El papel del *caudal-related homebox-2 (CDX2)* es esencial para el desarrollo y la diferenciación del tejido intestinal y está presente desde el nacimiento (a nivel de intestino delgado y colon) además es el responsable de numerosos procesos

relacionados con la proliferación, adhesión celular, tumorigénesis y la migración(12).

Los análisis de los genes y rutas moleculares implicados en el CCR han llevado al establecimiento de diferentes modelos como el fenotipo Supresor (CIN) o inestabilidad cromosómica, el fenotipo mutador (MSI) o inestabilidad microsatélites y el fenotipo metilador (CIMP) o CpG methylator phenotype, que explican la vía de progresión que desarrolla la enfermedad. La vía de la señal del Wnt a menudo juega un papel en la transformación del epitelio normal a las células tumorales y además en el epitelio normal preserva la homeostasis del epitelio, cuando esta vía está interrumpida produce la acumulación de beta-catenina a nivel nuclear e incrementa la proliferación. Pues bien, el CDX2 puede estar implicado en la proliferación celular y la migración mediado por un proceso cross-talk con la vía de la señal del Wnt, las proteínas del estroma del tumor y las citocinas implicadas en los fenómenos inflamatorios(13).

La baja expresión se relaciona con peor pronóstico(13,14) pero esto no ocurre cuando se ajusta con el estadio o el grado de diferenciación.

Además existe una correlación con los tumores de localización derecha(15) con mayor índice de recaídas en algunos estudios, y en dos de estos estudios se correlacionó esta localización con el peor pronóstico, y el estadio del tumor(16–18).

Lo siguiente a analizar fue la localización del tumor. En los últimos años existen multitud de estudios que han explorado la relación entre la localización del tumor y la respuesta a determinadas terapias biológicas y/o a la quimioterapia empleada en la enfermedad metastásica. Con un impacto en las decisiones que se pueden adoptar en la clínica(21,22), se considera que el colon derecho (ciego, colon ascendente, flexura hepática y colon trasverso) es el que se desarrolla embrionariamente desde el intestino medio (midgut), mientras que el izquierdo (ángulo hepático, colon descendente, sigma y recto) lo hace desde el intestino posterior (hindgut).

Esta diferencia en el desarrollo embrionario entre uno y otro son los que sostiene la hipótesis de la diferente respuesta a los tratamientos quimioterápicos, que incide en la supervivencia global y en el pronóstico.

4. HIPÓTESIS

La baja expresión de CDX2 en muestras de tumores colorrectales es un factor pronóstico independiente en pacientes con CCRM.

5. OBJETIVOS (PRINCIPAL Y ESPECÍFICOS)

5.1 Objetivo principal:

- Determinar la supervivencia en los pacientes que presentan baja expresión de CDX2 con CCRM.

5.2 Objetivos secundarios:

- Analizar de la relación de la expresión de CDX2 con el grado histológico.
- Analizar de la expresión de CDX2 con la lateralidad del tumor.
- Analizar de la expresión de CDX2 con factores sociodemográficos.
- Analizar de la expresión de CDX2 con la mutación de BRAF.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño del estudio.

Se trata de un estudio de cohortes retrospectivo donde se han analizado las muestras de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal metastásico durante un periodo de tiempo (4 años) y que estimamos en 36 meses (tiempo medio de supervivencia de los pacientes objetivo del estudio) antes del final del estudio, para que haya dado tiempo a la aparición de los eventos (exitus). Para comparar curvas de supervivencia se basa en el test logrank , asumiendo un modelo de riesgos proporcionales para los tiempos de supervivencia. Las muestras de los pacientes son de pacientes diagnosticados de CCR metastásico entre Enero del 2010 a Diciembre del 2013. Los casos se han obtenido de la base de datos del servicio de oncología médica del Hospital Universitario Infanta Cristina de Badajoz. Todas las muestras analizadas eran del tumor primario (bien por endoscopia o, en caso de haberse intervenido, de la pieza quirúrgica) o de las metástasis y con confirmación histológica para la realización de las

técnicas moleculares . Para cada paciente se determinó el tiempo de supervivencia como el tiempo en meses que transcurre entre la fecha del diagnóstico anatomopatológico y el fallecimiento en el caso no censurado, o la fecha fin del estudio en el caso censurado.

6.2 Ámbito de estudio

Son muestras de pacientes atendidos en el Hospital Universitario Infanta Cristina de Badajoz.

6.3 Sujetos del estudio (población, criterios de inclusión y exclusión)

- Población: Pacientes diagnosticados de carcinoma colorectal metastásico en el periodo de tiempo indicado en el Hospital Infanta Cristina de Badajoz. La selección de las muestras se obtienen de base de datos del servicio de oncología médica del Hospital Universitario Infanta Cristina de Badajoz.

Distribuidos por años las muestras analizadas fueron en total de 23 casos en el 2010, otros 23 en el 2011, 26 del año 2012 y solo 10 del 2013.

Todas las muestras analizadas eran del tumor primario (bien por endoscopia o, en caso de haberse intervenido, de la pieza quirúrgica)

El procedimiento realizado en cada caso es el que se desarrolla en el apartado siguiente.

Los criterios de inclusión eran pacientes con enfermedad metastásica al diagnóstico y que tuvieran confirmación histológica para la realización de las técnicas moleculares .

Para cada paciente se determinó el tiempo de supervivencia como el tiempo en meses que transcurre entre la fecha del diagnóstico anatomopatológico y el fallecimiento en el caso no censurado, o la fecha fin del estudio en el caso censurado. La fecha de fin de estudio fue el 30 de Diciembre del 2017.

Criterios de inclusión: Pacientes con diagnóstico anatomopatológico probado y que hayan fallecido antes de la fecha final del estudio.

Criterios de exclusión: Pacientes en los que no se ha podido determinar la fecha exacta del exitus o siguen vivos en el momento del análisis de los resultados.

6.4 Estudios Inmunohistoquímicos y moleculares

Con respecto a las técnicas anatomopatológicas para la proteína nuclear CDX2 de las muestras analizadas fijadas en formol e incluidos en parafina, se ha utilizado un sistema automatizado BOND III (Leica BIOSYSTEM™) con anticuerpo monoclonal de conejo antihumano, clon número EP25 (Máster Diagnóstica SL). Revelado con enzima HRP (peroxidasa de rábano), peróxido de hidrógeno y diaminobencina tetrahidrocloreto, y tinción de contraste con hematoxilinas. Todas las secciones fueron evaluadas de forma independiente por dos patólogos y, posteriormente, por ambos en microscopio bicabezal. La gradación de la inmunotinción se realizó en dependencia del tipo de marcaje citoplasmático, de membrana o nuclear de cada anticuerpo. El marcaje de membrana o citoplasmático fue considerado positivo para CDX2. La inmunotinción fue considerada independientemente de la intensidad, en función del porcentaje de células positivas según el siguiente esquema: 0: ausencia de tinción en menos del 20% de las células tumorales y 1: tinción en el 20% o más de las células tumorales. Como control positivo se utilizó mucosa colónica normal y como control negativo muestras procedentes de un tumor rabdoide teratoide atípico del Sistema Nervioso Central.

La extracción de ADN se realizó mediante lisis enzimática con proteinasa K a 56°C a partir de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, previamente desparafinados. Aislamiento y purificación de ADN del producto de lisis mediante columnas de centrifugación con membrana de sílice.

En lo que se refiere al estudio molecular para la determinación de las mutaciones de BRAF (del codón 600 del gen BRAF: V600E, V600K y V600D), BRAF (Mutation Analysis Kit, Entrogen, Inc®) se realizó mediante PCR a tiempo real con cebadores alelo-específicos. El producto de amplificación se detectó mediante sondas TaqMan, sondas marcadas con fluoróforo VIC, que son complementarias a las regiones de interés. De forma simultánea, en la misma reacción de PCR, se utilizaron cebadores y sonda TaqMan para detectar la amplificación de un control endógeno. Se incluyen controles positivos para cada mutación y una PCR sin templado como blanco/control de contaminaciones.

Los primers utilizados pertenecen a Entrogen y son marca registrada.

6.5 Variables del estudio

1. Variables independientes : La expresión de CDX2 de las muestras analizadas.
2. Variables dependientes: Otras variables de estos pacientes que confieren peor pronóstico son : la localización y el número de las metástasis (mejor pronóstico para pacientes oligometastásicos) , si el paciente ha sido sometido a cirugía del tumor primario y/o de las metástasis, otros factores moleculares atendiendo a la clasificación molecular del consorcio (CMS1 y CMS4 de peor pronóstico o la mutación de BRAF que también confiere peor pronóstico), localización del tumor primario (en los últimos estudios realizados sobre cohortes de pacientes muy extensas se ha demostrado peor pronóstico en colon derecho con respecto al lado izquierdo), criterios clínicos referidos a comorbilidades de los pacientes, grado histológico (peor pronóstico los de alto grado o muy indiferenciados), tipo histológico (peor pronóstico para los mucinosos o con células en anillo de sello)

6.6 Recogida de datos, plan de trabajo, recursos humanos y materiales:

1. Revisión crítica y recolección de la bibliografía. (Pubmed, Scopus, MEDES, Scielo). A través de PubMed, en primer lugar, buscamos las palabras claves en MeSH, el motivo del trabajo que es la expresión de CDX2, y lo que nos aparece en Decs es “*CDX2 Transcription Factor*” que es un término MeSH. Posteriormente hemos realizado la búsqueda para el término cáncer colorectal, con el resultado de “*colorectal neoplasms*”

Realizamos la búsqueda con estos dos términos y el operador booleano AND: “CDX2 Transcription factor” [Mesh] AND "Colorectal Neoplasms"[Mesh]. En total selecciona 264 artículos.

Al introducir una serie de filtros, como son la presencia de abstract, publicación en los últimos 10 años, en humanos y en idioma inglés, obtenemos 146 artículos. Éstos son los detalles de búsqueda: “CDX2 Transcription factor” [Mesh]. AND "Colorectal Neoplasms" [Mesh]. AND abstract[text] AND "2008/02/05"[PDat] : "2018/02/05"[PDat] AND "humans"[MeSH Terms] AND English[lang]. Introduciendo el término “prognosis”(MESH), la búsqueda se reduce a 56 artículos.

La búsqueda en *Google académico* sí arrojó gran cantidad de artículos (más de 4000) que hacían referencia a los dos descriptores, se realizó una selección de artículos publicados desde el 2004 y en los que los descriptores aparecieran en el título el artículo, con esta búsqueda encontramos dos revisiones interesantes, una de ellas un metanálisis (17,19,20) .

Realizando la búsqueda desde la plataforma de *Scopus* con los mismos buscadores Mesh haciendo restricciones en las fechas (desde el 2010 in All sources) encontramos multitud de artículos que no se corresponden a la búsqueda, acotando la misma a los ítems “Lack of CDX2” and “prognostic colorectal cancer”, aparece una publicación del año 2016 que hace referencia al tema del trabajo ha realizar.

En *Scielo*, sin hacer filtros sólo se han encontrado 10 publicaciones donde aparece “CDX2” pero ninguno referente al tema del trabajo.

En MEDES no existe, en el índice de materias, ninguna que haga referencia a Oncología, se ha realizado la búsqueda por revistas de Anatomía patológica y Aparato digestivo con esos términos sin obtener ningún resultado.

2. Realización de proyecto de investigación.

3.-Diseño de base de datos para el estudio.

4.- Aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética del Hospital Infanta Cristina. El estudio se ajusta a las normas éticas esenciales utilizadas como referencia en este ámbito y siendo valorado por el CEIm del Hospital Infanta Cristina decidiéndose por unanimidad expresar la idoneidad científica del proyecto así como su apoyo al mismo.

5. Realización de las determinaciones moleculares objetivo del estudio, en este caso contamos con la colaboración del servicio de anatomía patológica y el biólogo moecular.

6. Tratamiento estadístico de los resultados. En el análisis de los datos se ha hará uso del software estadístico IBM SPSS Statistics versión 22. Tras una estadística descriptiva de las variables, se ha realizado entre los diferentes factores pronósticos del cáncer colorrectal analizados (baja expresión de CDX2, localización del tumor, grado histológico y mutación de BRAF) y factores sociodemográficos en tablas de contingencia 2x2 . En este caso se ha realizado el test del chi-cuadrado, cuando se dieron las condiciones de validez para ello, y del test exacto de Fisher en otro caso. Se utilizó el test long-rank de Mantel Cox para comparar las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en las dos categorías (0,1), correspondientes a los factores pronósticos considerándose 1 el de peor pronóstico y 0 de mejor pronóstico. Se realizó también regresión de Cox (previa comprobación de la pertinencia del modelo de riesgos proporcionales), para comparar los riesgos de muerte en esas mismas dos categorías, al tiempo que se facilitan las funciones de impacto acumulado de las mismas. Todos los test estadísticos realizados se consideraran estadísticamente significativos para valores p inferiores a 0.05.

7. El consentimiento informado no es necesario al tratarse de muestras biológicas obtenidas con consentimiento previo del paciente al realizarse la prueba.

6.7 Tamaño muestral y análisis de datos:

Para el cálculo del tamaño muestral, no se tienen datos de estudios previos ni bibliografía de ningún estudio similar que nos sirva para calcular la muestra de nuestro estudio pero al tratarse de un análisis de supervivencia se ha realizado un estudio piloto (82 muestras) en el que se han realizado las determinaciones necesarias.

Hemos Realizado estadística descriptiva de las variables del estudio. Para ello hemos usado frecuencias absolutas y relativas en el caso de las variables cualitativas. Las variables cuantitativas según sigan o no una distribución normal tras la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk ($n < 50$) se verán resumidas mediante $Md \pm SD$ (media, desviación estandar) y rango (mínimo y máximo) o $P50 [P25 - P75]$ (mediana, rango intercuartílico) respectivamente.

Se realizará una comprobación de los grupos de estudios mediante test χ^2 o el test exacto de Fisher cuando sea necesario para las variables cualitativas. La comparación de las variables cuantitativas según los dos grupos de estudio, se efectuará mediante la T de Student para muestras independientes o U-Mann-Whitney (según sigan o no distribución normal).

Los datos se expresarán como media \pm desviación estándar excepto cuando se especifique otra medida. El análisis estadístico se llevará a cabo mediante el Test Exacto de Fisher y test de T de Student. Se considerará la significación estadística cuando $p < 0.05$.

6.8 Dificultades y limitaciones:

La limitación fundamental del estudio es que algunas muestras que se han intentado analizar no estaban disponibles en el servicio de Anatomía Patológica del hospital por que se habían cedido a otro centro para análisis de factores moleculares en estudio POSIBA o en algunas otras ocasiones por no tener muestra suficiente para dicho análisis.

7. RESULTADOS

Con respecto a la supervivencia global media del estudio se observó que era de 20,703 meses con una mediana de 12 meses ,se ha realizado el análisis ajustado por sexo de los pacientes incluidos los datos no censurados(tabla 9).

Existe una mayor proporción de muestras del sexo masculino con respecto al femenino 68.8% vs 31.3% respectivamente (tabla y figuras 3).

Debido a que la variable edad no sigue un patrón de distribución normal se ha hecho dicotómica (menores de 65 años y mayores o igual de 65 años), observándose que la población de mayor de 65 años en nuestro estudio tiene mayor incidencia además de esta manera se ha podido valorar su implicación en la supervivencia sin encontrar diferencias entre los dos grupos ($p=0.704$) (tabla 4 y figura 8).

Con respecto a la variable continua edad y la supervivencia, solo se facilita la función de impacto acumulado para la edad media. En este caso $\text{Exp}(B)=1,028$ (IC95%: 1,007-1,049), lo que significa que el riesgo instantáneo de muerte se multiplica por 1,028 (es decir, se incrementa un 2,8%) por cada año adicional del paciente y, con una confianza del 95%, ese incremento se sitúa entre un 0,7%

y un 4,9%. El factor multiplicador para el riesgo para 10 años de diferencia de edad sería 1,318, es decir, un incremento de riesgo de muerte en cada instante t de un 31,8% (IC95%: 7,2%-61,3%).(figuras 1 y 2).

Lo siguiente a analizar fue la localización del tumor, en nuestro análisis se ha comprobado una mayor proporción de enfermos con tumores del lado izquierdo (tabla y figura 5) 64.1% con respecto al derecho pero no existe relación con la baja expresión de CDX2($p=0,911$) ni la supervivencia ($p=0,552$) pero sí hay una tendencia a la significación estadística en cuanto a la edad mayores de 65 años y localización derecha (0,095).(tabla12).

En cuanto al grado histológico se observó una mayor proporción de pacientes con bajo grado 77.1 frente a 29.9% (tabla y figura 6)

Los datos obtenidos en la muestra reflejan de nuevo la proporción de pacientes que se describe en la literatura que presentan la mutación del BRAF (aproximadamente un 10%). (tabla y figura 7).

En lo relativo a la supervivencia y la relación con la mutación del BRAF el método de Kaplan-Meier detecta diferencias estadísticamente significativas ($p=0.009$) considerándose la supervivencia mayor en el caso de los pacientes que no presentan la mutación.(tabla10).(figura 11).

De acuerdo con el modelo de regresión de Cox, la covariable BRAF resulta estadísticamente significativa ($p=0.014$). De hecho, el factor $\text{Exp}(B)$ por el que hay que multiplicar el riesgo instantáneo de muerte en cualquier instante t al pasar del valor 1 al valor 0 (asumido que el individuo ha sobrevivido hasta el instante t) para la mutación de BRAF es igual a 0,403 (IC95%: 0,195-0,833) y esto significa que el valor BRAF=0 implica un riesgo instantáneo de muerte (en cada instante de tiempo) que es 0,403 veces el que supone el valor BRAF= 1 o dicho de otro modo, al pasar de un valor BRAF=0 a un valor BRAF=1 el riesgo instantáneo de muerte en cada instante t queda multiplicado por $1/0.403=2.481$.

Otros datos que hay que resaltar es la relación estadísticamente significativa ($p=0.004$) entre la mutación del BRAF y el grado histológico del tumor (se ve en más proporción en pacientes con tumores de alto grado) y la relación

estadísticamente significativa entre la mutación del BRAF y aquellos que tienen una baja expresión del CDX-2 ($p=0.000$). (tabla 12).

En lo que se refiere al análisis del motivo del reciente estudio los resultados han sido positivos para la relación de la baja supervivencia en los pacientes que presentan una baja expresión de CDX2 ($p=0,011$) alcanzando una media de supervivencia de 6,9 meses. Para CDX2, el $EXP(B)=0,354$ (IC95%: 0,159-0,786), y eso significa que el valor CDX2 con expresión normal implica un riesgo instantáneo de muerte (en cada instante de tiempo) que es 0,354 veces el que supone el valor CDX2 con baja expresión (o bien, ese riesgo se multiplica por $1/0,354=2,825$ en individuos con CDX2 con baja expresión frente a los que tienen CDX2 con expresión normal). (tabla 11 y figura 12)

La baja expresión de CDX2 aparece en un 8,8% de las muestras (tabla y figura 8), y como se ha referido con anterioridad existe una relación entre la baja expresión, la mutación de BRAF y el alto grado histológico. (figuras 13 y 14).

8, DISCUSIÓN:

En relación con las variables demográficas (edad y sexo) los resultados obtenidos coinciden con lo reflejado en las fuentes consultadas(1).

Con mayor frecuencia afectan a pacientes mayores de 65 años y al sexo masculino, no existiendo diferencias en la supervivencia de estos pacientes en función de estas dos variables.

Se conoce que la edad es el mayor factor de riesgo de padecer cáncer de colon esporádico. Es poco frecuente antes de los 40 años y se incrementa su incidencia específica en cada década exponencialmente. En nuestra serie el 67% de los pacientes estaban en la franja de edad \geq a 65 años.

Con respecto al sexo, existe una proporción mayor en el sexo masculino que en el femenino.

En la década de los 90 la media de los pacientes con CCR avanzado estaba entorno a los 12 meses. Con la incorporación del oxaliplatino y el irinotecan se consiguieron supervivencias de aproximadamente 18 meses y la posterior introducción de las terapias biológicas junto a los avances en el tratamiento

quirúrgico y radioterápico se alcanzan supervivencias de hasta 24 meses. En nuestra serie la supervivencia media alcanzada fue de 20.703 meses.

Un dato revelador es que existe un grupo de pacientes que superan esa media y llegan a alcanzar supervivencias de mas de 5 años. Por este motivo pretendemos analizar otras variables, además de las puramente clínicas, que puedan ofrecernos más información a la hora de establecer estrategias a seguir en estos pacientes.

En cuanto a la localización del tumor primario no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia del lado derecho y el izquierdo ni relación con la baja expresión de CDX2($p=0.411$), al contrario de lo esperado por lo que hay reflejado en la literatura, probablemente por el tamaño muestral.

En lo que se refiere a la baja expresión de CDX2 existe una menor supervivencia en este grupo de pacientes y una relación estadísticamente significativa con otros factores de mal pronóstico como la mutación de BRAF y el alto grado histológico.

9. CONCLUSIONES

La baja expresión de CDX2 es un factor de mal pronóstico en enfermos diagnosticados de carcinoma colorrectal metastásico y por lo tanto su análisis puede ser útil a la hora de establecer estrategias de tratamientos en este escenario. Además se relaciona con tumores que presentan mutación de BRAF y alto grado histológico.

En base a los resultados de nuestro trabajo, sería interesante el realizar estudios prospectivos aleatorizados para analizar cual puede ser la implicación de este marcador como predictivo de respuesta a los tratamientos quimioterápicos.

TABLAS Y ANEXOS:

VARIABLES analizadas		Número total	Porcentaje
Sexo	Mujer	25	31.2%
	Hombre	55	68,8%
Edad	< 65 años	26	32.9%
	>= 65 años	53	67.1%
Localización del tumor	Derecha	28	35.9%
	Izquierda	50	64.1%
Grado histológico	Alto grado	15	21.7%
	Bajo grado	54	78.3%
Mutación de BRAF	Mutado	9	11.3%
	No mutado	61	76.3%
Expresión de CDX2	Alta expresión	73	91.3%
	Baja expresión	7	8.8%

Tabla 1. Distribución de las variables del estudio.

VARIABLES	BRAF	CDX2
0	NO MUTADO	ALTA EXPRESIÓN
1	MUTADO	BAJA EXPRESIÓN

VARIABLES	LOCALIZACIÓN	GRADO HISTOLÓGICO	SEXO
0	DERECHO	BAJO	HOMBRE
1	IZQUIERDO	ALTO	MUJER

Tabla 2. Correspondencias de las variables recogidas en el estudio para el análisis estadístico.

SEXO

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos Mujer	25	31,3	31,3	31,3
Hombre	55	68,8	68,8	100,0
Total	80	100,0	100,0	

Tabla 3. Distribución de variable sexo.

EDAD			SEXO		Total
			Mujer	Hombre	
EDADcat65 >65	Recuento		20	33	53
	% dentro de EDADcat65		37,7%	62,3%	100,0%
	% dentro de SEXO		80,0%	61,1%	67,1%
<=65	Recuento		5	21	26
	% dentro de EDADcat65		19,2%	80,8%	100,0%
	% dentro de SEXO		20,0%	38,9%	32,9%

Tabla 4. Distribución variable edad (> o <= 65 años)

LOCALIZACIÓN

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos Colon Derecho	28	35,0	35,9	35,9
Colon Izquierdo	50	62,5	64,1	100,0
Total	78	97,5	100,0	
Perdidos Sistema	2	2,5		
Total	80	100,0		

Tabla 5. Distribución de variable localización de tumor primario.

Grado histológico		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Bajo	54	67,5	77,1	77,1
	Alto	16	20,0	22,9	100,0
	Total	70	87,5	100,0	
Perdidos	Sistema	10	12,5		
Total		80	100,0		

Tabla 6. Distribución de variable grado histológica.

BRAF

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No mutado	61	76,3	87,1	87,1
	Mutado	9	11,3	12,9	100,0
	Total	70	87,5	100,0	
Perdidos	Sistema	10	12,5		
Total		80	100,0		

Tabla 7. Distribución de variable mutación de BRAF.

EXPRESIÓN DE CDX2

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	73	91,3	91,3	91,3
	1	7	8,8	8,8	100,0
	Total	80	100,0	100,0	

Tabla 8 :Distribución de variable expresión de CDX2.

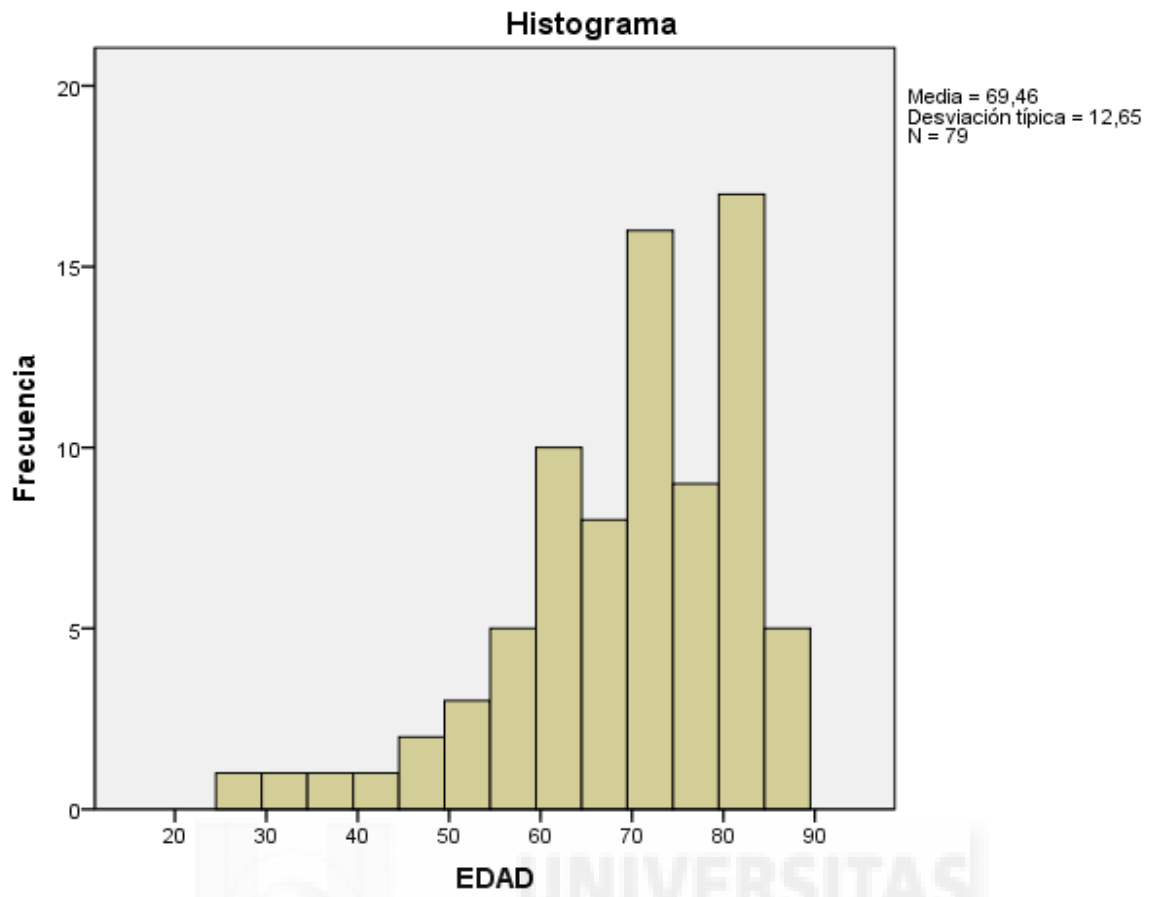


Figura 1: Histograma de la distribución de la muestra de la variable edad.

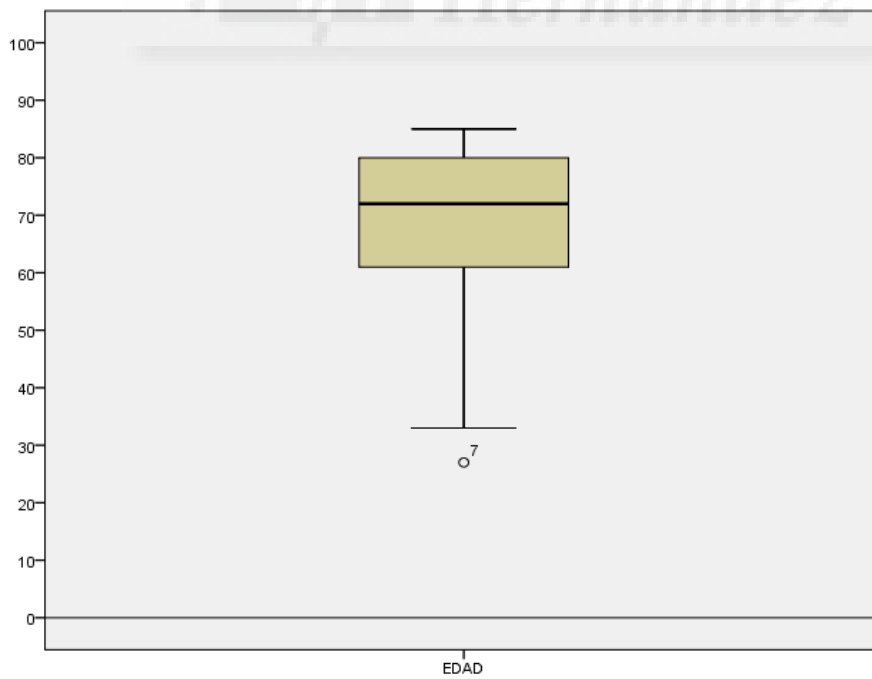


Figura 2: boxplot de la distribución de la variable edad.

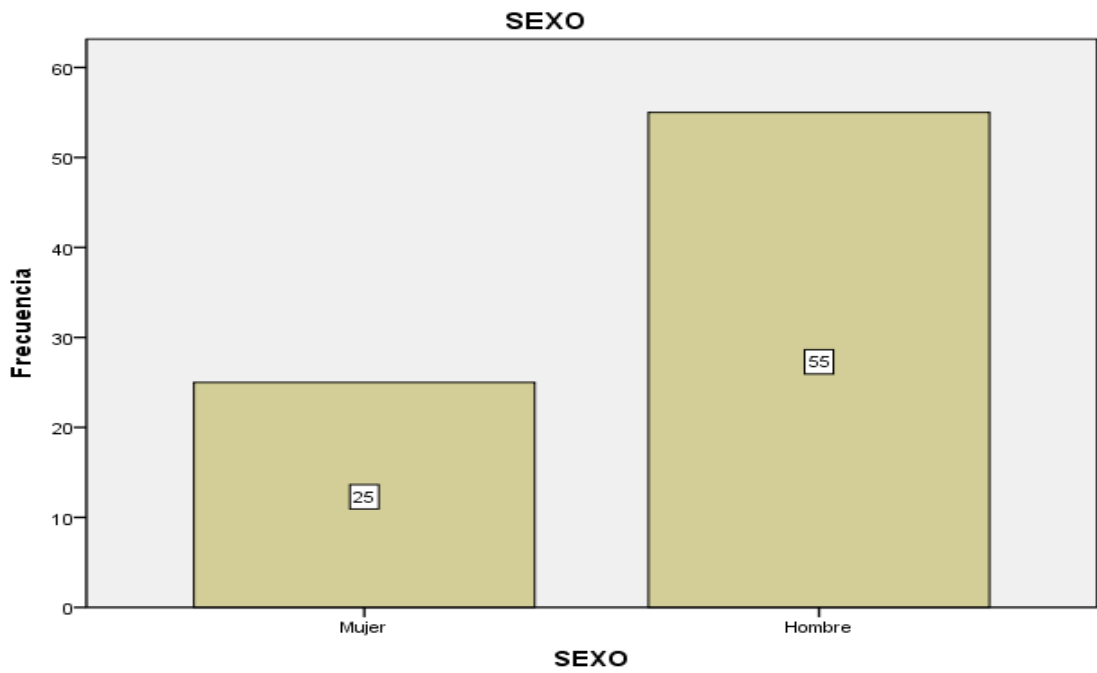


Figura 3. Diagrama de barras de variable sexo.

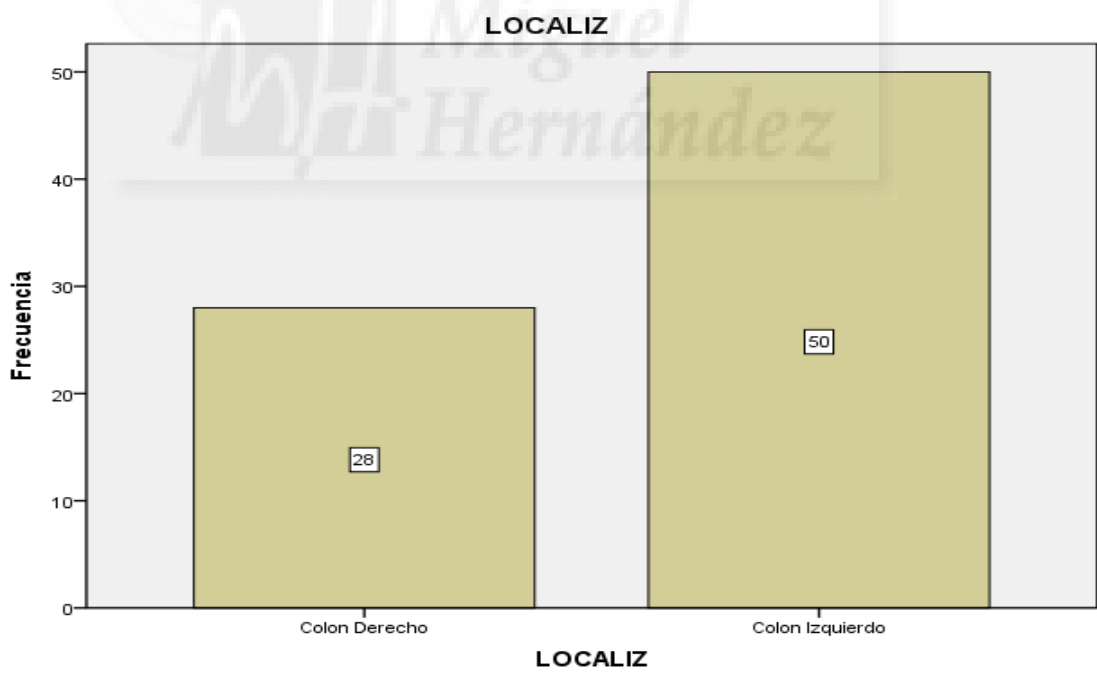


Figura 4. Diagrama de barras de variable Localización de tumor primario.

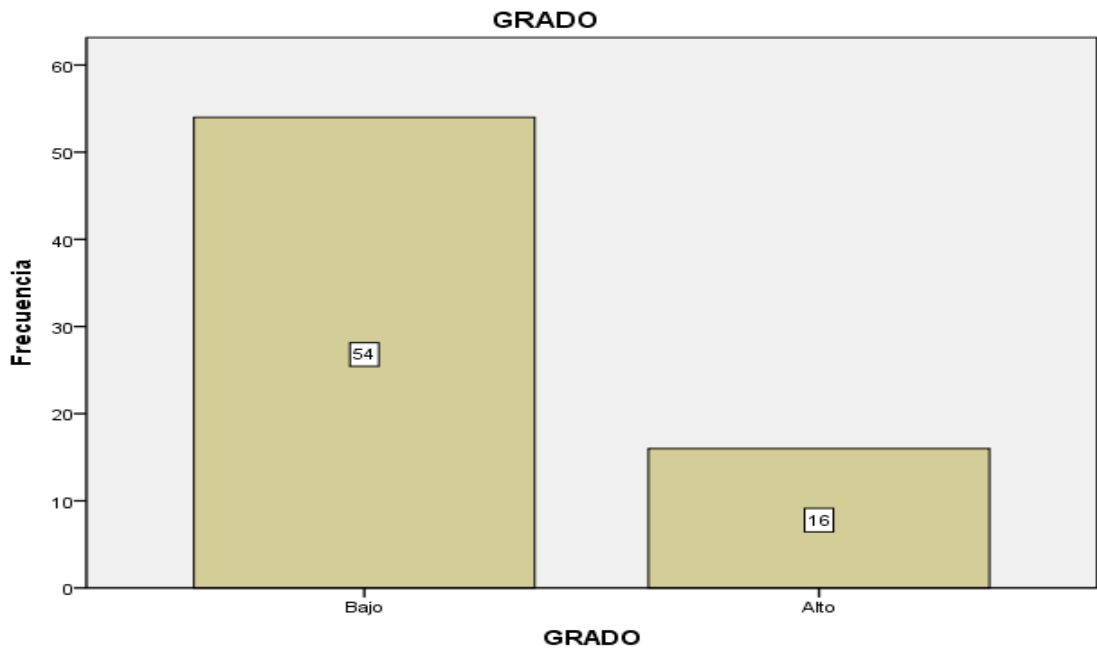


Figura 5. Diagrama de barras de variable grado histológico.

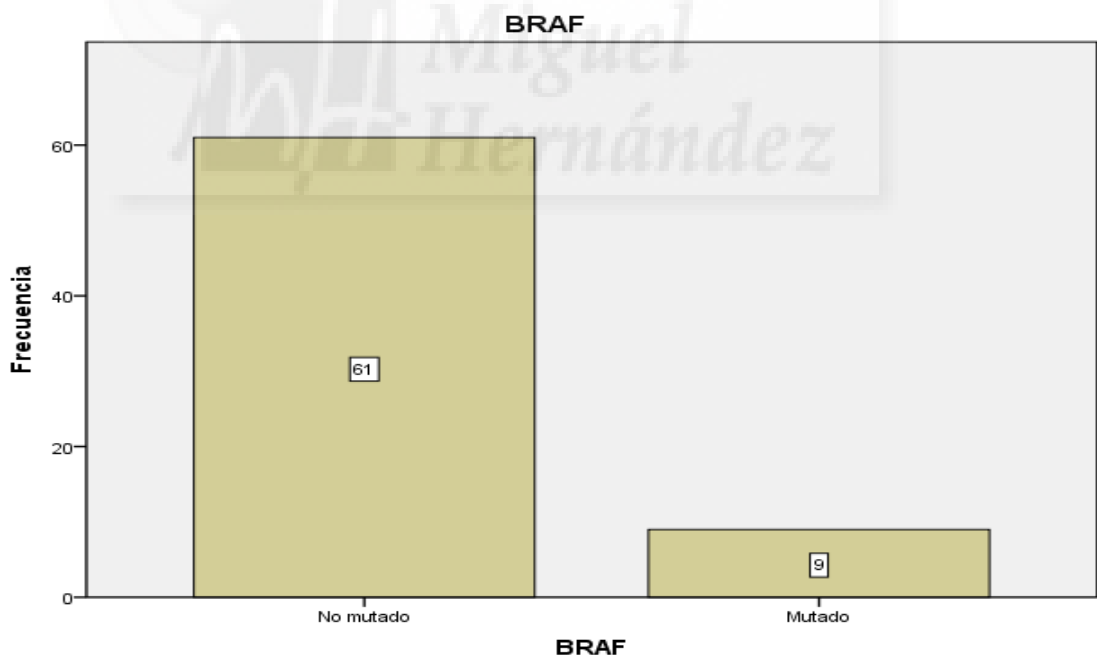


Figura 6. Diagrama de barras de variable mutación de BRAF.

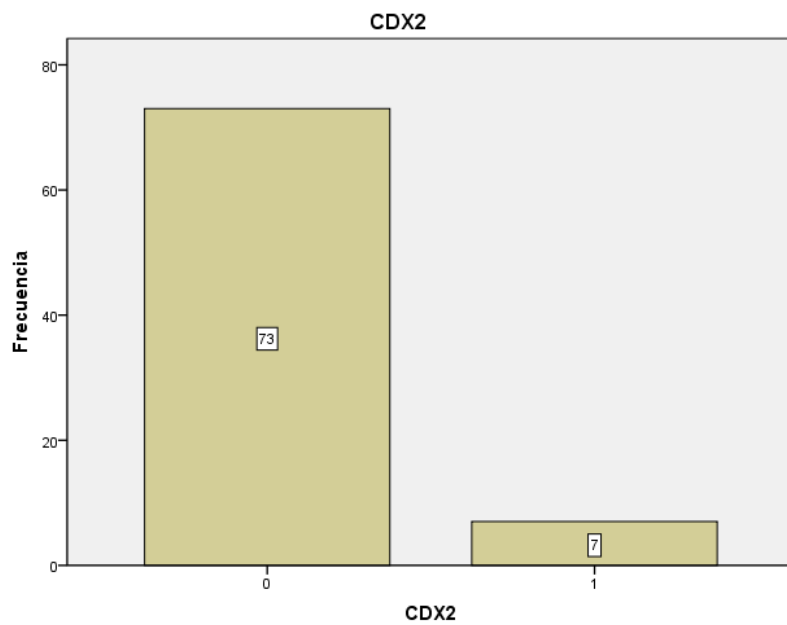


Figura 7: Diagramas de barras de variable expresión de CDX2.



TABLAS Y GRÁFICAS DE ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Medias y medianas del tiempo de supervivencia

SEXO	Media				Mediana	
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico
			Límite inferior	Límite superior		
Mujer	20,840	4,058	12,887	28,793	12,000	2,290
Hombre	19,761	3,055	13,772	25,750	13,000	3,174
Global	20,703	2,647	15,515	25,890	12,000	1,892

SEXO	Mediana	
	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior
Mujer	7,512	16,488
Hombre	6,780	19,220
Global	8,292	15,708

Tabla 9. Análisis de mediana y media del estudio.

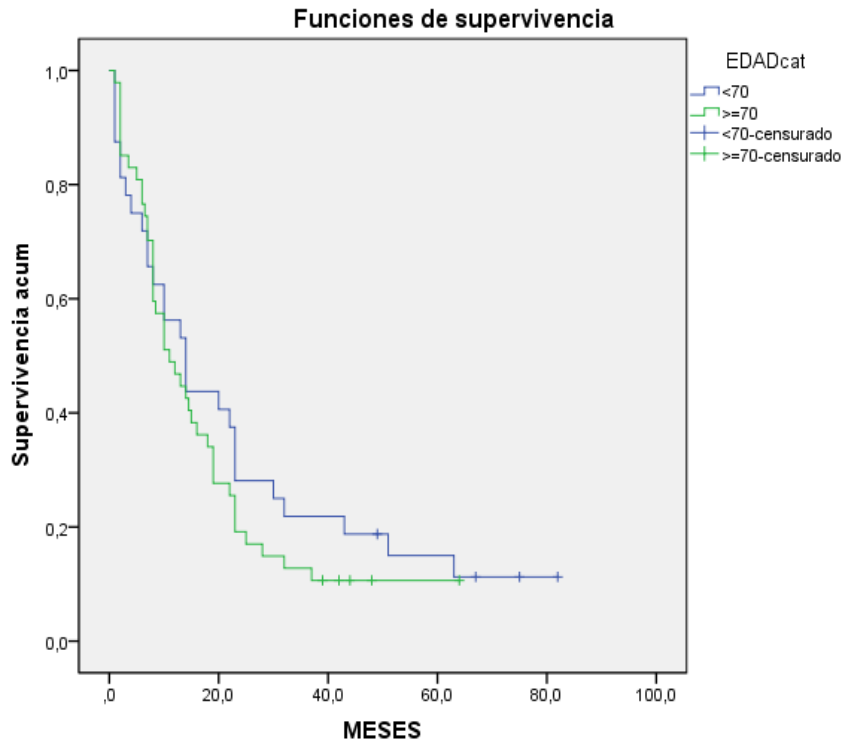


Figura 8: Supervivencia acumulada en función de la edad (mayor o menor de 70 años)

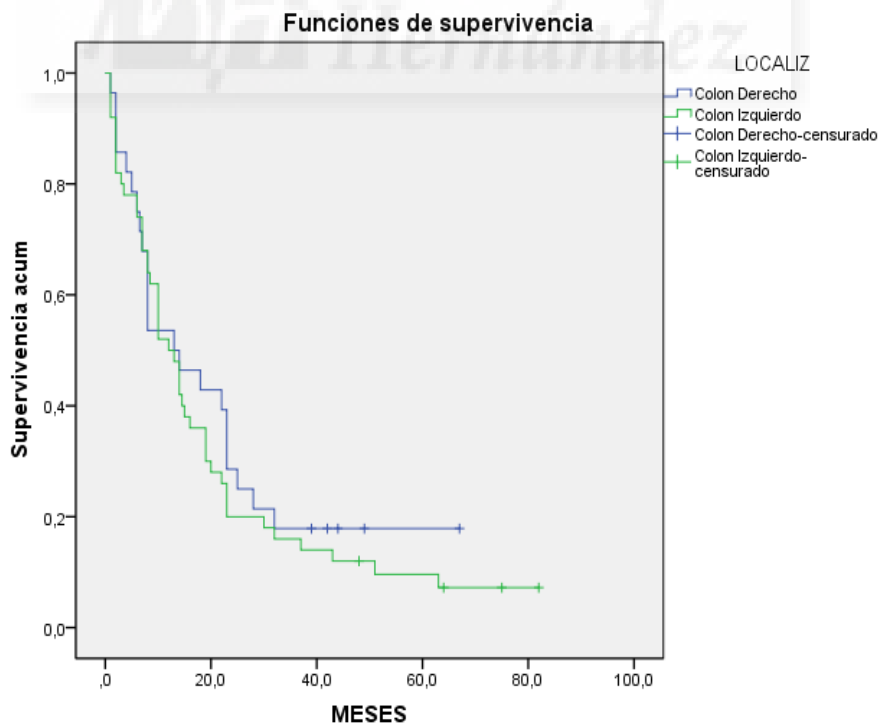


Figura 9: Supervivencia acumulada en función de localización del tumor primario.

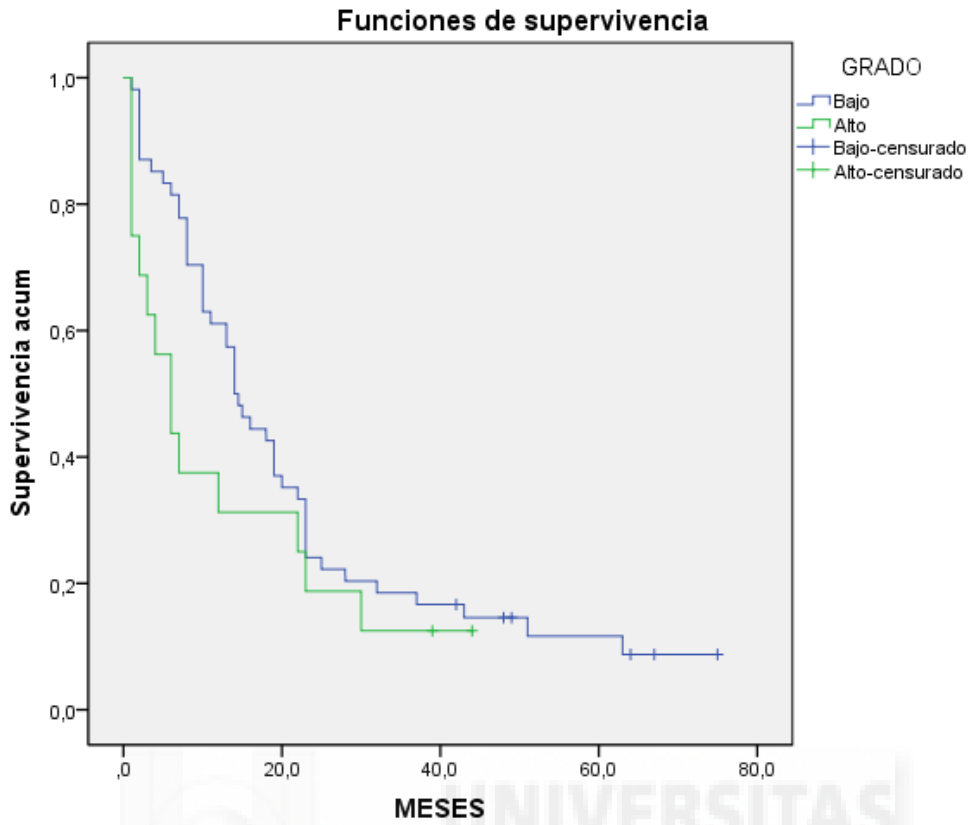


Figura 10: Supervivencia acumulada de la variable grado histológico.

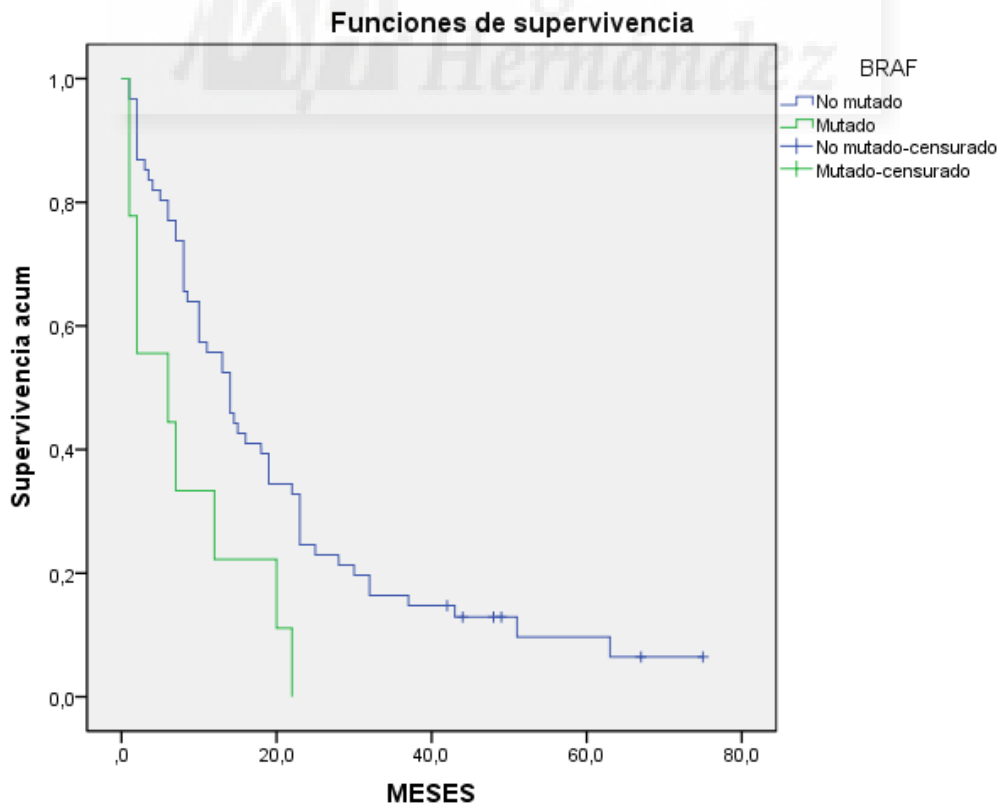


Figura 11: Supervivencia acumulada de variable mutación de BRAF.

Comparaciones globales para BRAF	Chi-cuadrado	Gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,823	1	,009

Tabla 10. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de BRAF.

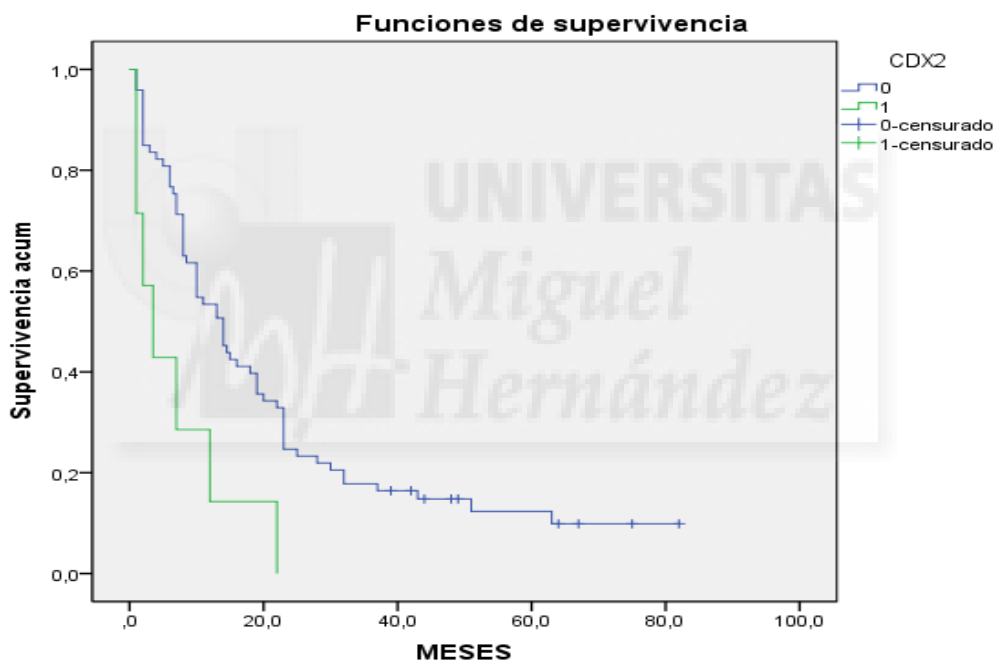


Figura 12: Supervivencia acumulada de variable expresión de CDX2.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7,560	1	,006

Tabla 11. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de CDX2.

TABLAS DE CONTINGENCIA

P-VALOR	SEXO	EDAD	LOCALIZ	GRADO	BRAF
SEXO					
EDAD	Chi:0,097				
LOCALIZ	Chi:0,990	Chi:0,095			
GRADO	Chi:0,551	F:0,535	F:1,00		
BRAF	F:0,265	F:0,056	F:0,707	F:0,004	
CDX2	F:0,169	Chi:0,678	F:0,411	F:0,022	F:0,00

Tabla 12. Comparación de los factores pronósticos 2 a 2: Se incluye el test realizado (Chi:Chi cuadrado de Pearson o F: test exacto de Fisher) y el p valor del test (rojo=significativo, azul=indicios de significación).

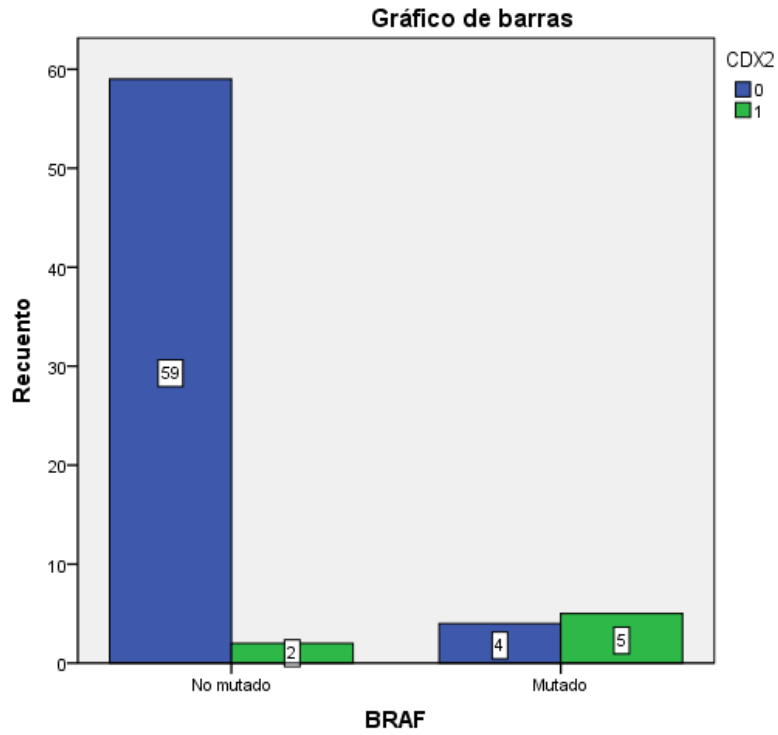


Figura 13: Gráfico de barras de variables “mutación de BRAF” y “Expresión de CDX2”

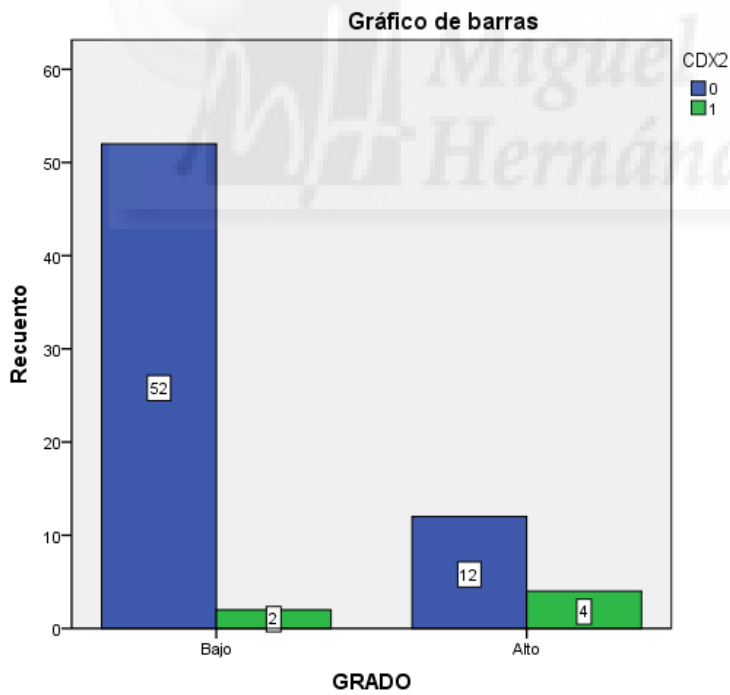


Figura 14: Gráfica de barras de variables “grado histológico” y “expresión de CDX2”

BIBLIOGRAFÍA:

1. Globocan 2012 - Home [Internet]. [citado 22 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
2. Cunningham D, Atkin W, Lenz H-J, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet* (London, England). marzo de 2010;375(9719):1030-47.
3. Search - UpToDate [Internet]. [citado 23 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/search>
4. Wielandt AM, Villarroel C, Hurtado C, Simian D, Zamorano D, Martinez M, et al. [Characterization of patients with sporadic colorectal cancer following the new Consensus Molecular Subtypes (CMS)]. *Rev Med Chil*. abril de 2017;145(4):419-30.
5. Auclin E, Zaanani A, Vernerey D, Douard R, Gallois C, Laurent-Puig P, et al. Subgroups and Prognostication in Stage III Colon Cancer: Future Perspectives for Adjuvant Therapy. *Ann Oncol*. 2017;(January):mdx030.
6. Bilgin B, Sendur MA, Akinci MB, Yalcin B. Negative CDX2 expression can be an important predictive and prognostic biomarker in stage II colon cancer. *J BUON*. 2017;22(1):282-3.
7. Dalerba P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, et al. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2016;374(3):211-22.
8. Tomasello G, Barni S, Turati L, Ghidini M, Pezzica E, Passalacqua R, et al. Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer*. febrero de 2018;
9. Pilati C, Taieb J, Balogoun R, Marisa L, de Reynies A, Laurent-Puig P. CDX2 prognostic value in stage II/III resected colon cancer is related to CMS classification. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. mayo de 2017;28(5):1032-5.
10. Zhang BY, Jones JC, Briggler AM, Hubbard JM, Kipp BR, Sargent DJ, et al. Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. junio de 2017;16(2):124-8.
11. Oncology Clinical Practice Guidelines | ESMO [Internet]. [citado 23 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.esmo.org/Guidelines>
12. Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. noviembre de 2004;17(11):1392-9.
13. Kim JH, Rhee Y-Y, Bae JM, Cho N-Y, Kang GH. Loss of CDX2/CK20

expression is associated with poorly differentiated carcinoma, the CpG island methylator phenotype, and adverse prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* octubre de 2013;37(10):1532-41.

14. Maus MKH, Hanna DL, Stephens CL, Astrow SH, Yang D, Grimminger PP, et al. Distinct gene expression profiles of proximal and distal colorectal cancer: implications for cytotoxic and targeted therapy. *Pharmacogenomics.* 2015;15(4):354-62.
15. Okoń K, Zazula M, Rudzki Z, Papla B, Osuch C, Stachura J. CDX-2 expression is reduced in colorectal carcinomas with solid growth pattern and proximal location, but is largely independent of MSI status. *Polish J Pathol.* 2004;55(3):9-14.
16. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut.* enero de 2011;60(1):116-29.
17. Winn B, Tavares R, Matoso A, Noble L, Fanion J, Waldman SA, et al. Expression of the intestinal biomarkers Guanylyl cyclase C and CDX2 in poorly differentiated colorectal carcinomas. *Hum Pathol.* enero de 2010;41(1):123-8.
18. Knosel T, Chen Y, Hotovy S, Settmacher U, Altendorf-Hofmann A, Petersen I. Loss of desmocollin 1-3 and homeobox genes PITX1 and CDX2 are associated with tumor progression and survival in colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* noviembre de 2012;27(11):1391-9.
19. Yu H, Zhang H, Cao Q, Zhu W. The prognostic value of CDX2 in colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(8):15955-60.
20. Olsen J, Espersen MLM, Jess P, Kirkeby LT, Troelsen JT. The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review. *Surg Oncol.* 2014;23(3):167-76.
21. Schrag D, Weng S, Brooks G, Meyerhardt JA, Venook AP. The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 20 de mayo de 2016;34(15_suppl):3505.
22. Jung M-K, Sup Shin U, Ki Y-J, Kim Y-B, Moon S-M, Sung S-J. Is the Location of the Tumor Another Prognostic Factor for Patients With Colon Cancer? *Ann Coloproctol.* 2017;33(6):210-8.