

**La ratio de metilación del gen *SEPTINA9* predice la respuesta tumoral a la
terapia neoadyuvante total en pacientes con cáncer de recto localmente
avanzado**

Índice

Resumen	2
Introducción	5
Hipótesis y objetivos	7
Material y métodos	8
Resultados	14
Discusión	21
Conclusiones	26
Bibliografía	27

Resumen

Introducción

El tratamiento estándar del cáncer de recto localmente avanzado (T3/4 y/o N+) incluye la quimiorradioterapia neoadyuvante seguida de la cirugía radical con escisión mesorrectal total y la quimioterapia adyuvante. Este esquema de tratamiento trimodal consigue un buen control local de la enfermedad, con bajas tasas de recidiva local, pero no tan buen control sistémico, con tasas de metástasis a distancia de hasta el 39%. Además, la cirugía radical conlleva una importante morbilidad en forma de disfunción urinaria y sexual, incontinencia fecal, estomas, complicaciones postquirúrgicas como infección del sitio quirúrgico, fuga anastomótica, eventraciones... que afecta de forma significativa a la calidad de vida.

Por estos motivos, durante las últimas décadas ha surgido un creciente interés en los protocolos de preservación de órgano en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado. De este modo, la terapia neoadyuvante total, que consiste en administrar todo el tratamiento oncológico antes de evaluar la respuesta al tratamiento y plantear la necesidad de cirugía, surge con la intención de obtener el máximo número posible de respuestas clínicas completas que permita evitar la cirugía y llevar a cabo un seguimiento dentro de un protocolo de *“watch and wait”* en estos pacientes, así como mejorar el control sistémico de la enfermedad.

La respuesta tumoral a la quimiorradioterapia neoadyuvante es un factor pronóstico importante en los pacientes con cáncer de recto localmente avanzado. Pese a haberse propuesto múltiples marcadores, no existen actualmente biomarcadores suficientemente validados que permitan

predecir la respuesta tumoral a la terapia neoadyuvante total en estos pacientes.

Hipótesis y objetivos

La **hipótesis** de este estudio postula que el nivel de metilación del gen *SEPTINA9*, medido mediante la ratio de metilación de dicho gen, se correlaciona con la probabilidad de obtener una respuesta clínica completa a la terapia neoadyuvante total, así como con el tamaño y el estadio tumoral, en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado. De este modo, aquellos pacientes con un menor nivel de metilación del gen *SEPTINA9* presentarían tamaños tumorales menores y estadios tumorales más precoces, así como una mayor probabilidad de obtener una respuesta clínica completa a la terapia neoadyuvante total y beneficiarse de un seguimiento estrecho sin necesidad de someterse a una cirugía radical. Por el contrario, aquellos pacientes con un nivel de metilación del gen *SEPTINA9* alto presentarían tamaños tumorales mayores y estadios tumorales más avanzados, así como una menor probabilidad de alcanzar una respuesta clínica completa.

El **objetivo** consiste por tanto en evaluar la utilidad de la ratio de metilación del gen *SEPTINA9* como biomarcador predictor de la respuesta tumoral a la terapia neoadyuvante total y su correlación con el tamaño del tumor y el estadio tumoral en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.

Material y métodos

Se incluyeron en el estudio pacientes diagnosticados de cáncer de recto localmente avanzado (adenocarcinoma de recto T3/4 y/o N+ confirmado histológicamente) sometidos a terapia neoadyuvante total con intención de preservación de órgano. El tamaño y el estadio tumoral al diagnóstico se

determinaron mediante resonancia magnética. El nivel de metilación del gen *SEPTINA9* en ADN libre en plasma se analizó mediante PCR digital en gotas en el momento del diagnóstico y se expresó en forma de ratio (cociente entre copias metiladas y no metiladas del gen). Tras completar la terapia neoadyuvante total, se evaluó la respuesta tumoral mediante resonancia magnética y rectoscopia. Se analizó la asociación entre el nivel de metilación del gen *SEPTINA9*, el tamaño tumoral, el estadio tumoral y la respuesta tumoral a la terapia neoadyuvante total.

Resultados

Se incluyeron en el estudio 60 pacientes. La ratio de metilación del gen *SEPTINA9* ($p=0.006$), el tamaño tumoral ($p=0.009$) y el estadio T ($p=0.042$), pero no el estadio N, mostraron asociación estadísticamente significativa con la respuesta tumoral a la terapia neoadyuvante total (a menor ratio de metilación, menor tamaño tumoral y menor T, mayor probabilidad de respuesta completa). La ratio de metilación del gen *SEPTINA9* también mostró moderada correlación estadísticamente significativa con el estadio N (coeficiente de correlación 0.29, $p=0.022$) y el tamaño tumoral (0.32, $p=0.016$), pero no con el estadio T (0.15, $p=0.256$).

Conclusiones

La ratio de metilación del gen *SEPTINA9* se correlaciona con el tamaño tumoral y el estadio N, y constituye un buen biomarcador para predecir la respuesta tumoral a la terapia neoadyuvante total en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado.

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) constituye el tercer cáncer más frecuente a nivel global, mientras que el cáncer de recto (CR) presenta una incidencia aproximada de 732.000 casos nuevos al año, según datos de la *American Society of Clinical Oncology*. [1] El cáncer de recto localmente avanzado (CRLA) se define como aquel CR en un estadio T3/4 y/o N+. El tratamiento estándar de CRLA, que incluye la quimiorradioterapia neoadyuvante seguida de cirugía radical con escisión mesorrectal total y posteriormente quimioterapia adyuvante, logra buenas tasas de supervivencia y un excelente control local de la enfermedad, con bajas tasas de recurrencia local, pero no tan buen control sistémico, con tasas de metástasis a distancia de hasta el 39%. [2] Además, la cirugía radical lleva asociada una importante morbilidad en forma de disfunción urinaria y sexual, incontinencia fecal, estomas, complicaciones postquirúrgicas como infección del sitio quirúrgico, fuga anastomótica, eventraciones... que afecta de forma significativa a la calidad de vida. [3]

En consecuencia, durante las últimas décadas ha tenido lugar un creciente interés en los protocolos de preservación de órgano en un intento de evitar la morbilidad derivada de la cirugía en aquellos pacientes con respuesta clínica completa (RCC) al tratamiento neoadyuvante. La terapia neoadyuvante total (TNT), que consiste en administrar todo el tratamiento oncológico antes de evaluar la respuesta al tratamiento y plantear la necesidad de cirugía, ha demostrado conseguir un mejor control sistémico de la enfermedad y mayores tasas de RCC, permitiendo evitar la cirugía en aquellos pacientes con una RCC dentro de un protocolo de seguimiento estrecho o "*watch and wait*" (WW). [2]

La respuesta tumoral a la quimiorradioterapia neoadyuvante constituye un factor pronóstico importante en los pacientes con CRLA. Se han propuesto múltiples marcadores, pero no se ha desarrollado ningún biomarcador que permita predecir la respuesta tumoral a la TNT en pacientes con CRLA lo suficientemente fiable como para alcanzar la práctica clínica habitual, ya que todos ellos presentan importantes limitaciones. [4]

La metilación del gen *SEPTINA9* (mSEPT9) es un fenómeno epigenético que tiene lugar durante la carcinogénesis del CCR y constituye un biomarcador plasmático validado para la detección y el diagnóstico precoz del CCR. [5] Además, también se ha demostrado su utilidad como marcador de resección quirúrgica completa y recurrencia tumoral durante el seguimiento tras la cirugía en pacientes con CCR. [6,7]

Sin embargo, hasta el momento no se ha investigado el valor del nivel de mSEPT9 como predictor de la respuesta tumoral a la TNT en pacientes con CRLA.

Hipótesis y objetivos

El **objetivo** de este estudio es evaluar la utilidad del nivel de mSEPT9 como biomarcador predictor de la respuesta tumoral a la TNT y su correlación con el tamaño y el estadio tumorales en pacientes con CRLA.

Planteamos por tanto como **hipótesis** que el nivel de mSEPT9, medido mediante la ratio de metilación de dicho gen, se correlaciona con la probabilidad de obtener una RCC a la TNT, así como con el tamaño y el estadio tumoral, en pacientes con CRLA. De este modo, aquellos pacientes con un menor nivel de mSEPT9 presentarían tamaños tumorales menores y estadios tumorales más precoces, así como una mayor probabilidad de obtener una RCC a la TNT y beneficiarse de un seguimiento estrecho sin necesidad de someterse a una cirugía radical. Por el contrario, aquellos pacientes con un nivel de mSEPT9 alto presentarían tamaños tumorales mayores y estadios tumorales más avanzados, así como una menor probabilidad de alcanzar una RCC.

Material y métodos

Selección de pacientes

Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes con CRLA (T3/4 y/o N+) confirmado histológicamente incluidos en un protocolo de TNT con el objetivo de preservación de órgano tras la discusión de cada caso en un comité multidisciplinar.

Diagnóstico del CRLA

El diagnóstico de CRLA se llevó a cabo mediante tacto rectal (TR), resonancia magnética (RM) y rectoscopia con biopsia positiva para adenocarcinoma. El tamaño tumoral (teniendo en cuenta su diámetro mayor) y el estadio tumoral en el momento del diagnóstico fueron determinados mediante RM. La ausencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico fue confirmada mediante la realización de un TC toraco-abdomino-pélvico en cada caso.

Tratamiento del CRLA

Tras el diagnóstico de CRLA, los pacientes recibieron uno de los siguientes esquemas de TNT con el objetivo de preservación de órgano:

- Quimiorradioterapia con radioterapia de ciclo corto o largo y quimioterapia sensibilizante concomitante con capecitabina seguida de 6 a 8 ciclos de quimioterapia sistémica de consolidación con FOLFOX (oxaliplatino, 5-fluorouracilo y ácido folínico).

- Quimioterapia de inducción con FOLFOX seguida de quimiorradioterapia con radioterapia de ciclo corto o largo y quimioterapia sensibilizante concomitante con capecitabina.

Evaluación de la respuesta tumoral a la TNT

Tras completar la TNT, se evaluó la respuesta tumoral mediante TR, rectoscopia y RM. Dicha respuesta se clasificó siguiendo el grado de regresión tumoral por RM (mrTRG, del inglés *magnetic resonance Tumor Regression Grade*): [8]

1. **mrTRG 1:** Respuesta completa. No hay evidencia tumor o solamente se observa fibrosis.
2. **mrTRG 2:** Buena respuesta. Fibrosis densa o tumor residual mínimo.
3. **mrTRG 3:** Respuesta moderada. Fibrosis/mucina mixta y señal intermedia que representa tumor residual, pero predomina la fibrosis.
4. **mrTRG 4:** Respuesta escasa. Pequeñas áreas de fibrosis o mucina, pero principalmente tumor.
5. **mrTRG 5:** Sin respuesta. Misma apariencia que el tumor original o crecimiento tumoral.

Los pacientes con mrTRG grado 1-2 y rectoscopia negativa fueron clasificados como RCC, incluidos en un protocolo de WW y sometidos a un seguimiento estrecho mediante TR, TC, RM y rectoscopia. En cambio, aquellos pacientes con mrTRG grado 3-5 y/o rectoscopia positiva, y que por tanto no alcanzaron una RCC, fueron sometidos a cirugía (amputación abdominoperineal, resección anterior baja o resección local transanal dependiendo de cada caso).

Análisis del nivel de mSEPT9

En cada paciente, el nivel de mSEPT9 en ADN libre (cfDNA, del inglés *cell-free DNA*) en plasma se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas (ddPCR, del inglés *droplet digital Polymerase Chain Reaction*).

En el momento del diagnóstico del CRLA, antes de comenzar la TNT, se recolectaron 20ml de sangre periférica completa de cada paciente en 2 tubos de EDTA de 10mL. El plasma fue aislado en un tiempo máximo de 2h a través de dos pasos de centrifugación de las muestras de sangre: un primer paso a 1800G y 4°C durante 10 minutos para eliminar los restos celulares, seguido de una segunda centrifugación a 3000G y 4°C durante otros 10 minutos. Una vez aislado, el plasma se congeló en alícuotas de 1mL a -80°C para su almacenaje y su posterior análisis.

Tras ello, se llevó a cabo el aislamiento del cfDNA, utilizando el Kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen, Hilden, Alemania). El cfDNA aislado se trató posteriormente con un kit de metilación de ADN mediante columnas de centrifugación (ZymoResearch, Irvine, CA, EE.UU.).

El nivel de mSEPT9 en cfDNA fue analizado mediante ddPCR QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, EE.UU.). Las muestras de cfDNA aislado de plasma fueron preparadas mezclando 10µL de ddPCR Supermix para sondas No dUTP (Bio-Rad Laboratories), 1µL de sondas fluorescentes FAM y HEX (específicas para el gen metilado y no metilado respectivamente) y hasta 8.8µL de ADN molde en un volumen de reacción final de 20µL. Se analizaron tres réplicas por muestra. Se utilizó agua libre de nucleasas en lugar de ADN como control negativo de PCR. El

ADN de la línea celular HCT116, que presenta hipermetilación en el gen *SEPTINA9*, se utilizó como control positivo.

Se generaron gotas de ddPCR con la mix de PCR y las muestras mediante el generador de gotas QX200 (Bio-Rad Laboratories), y la amplificación de ADN mediante el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). Para la ddPCR se emplearon cebadores o *primers* para el gen *SEPTINA9* (5'-AGAGAATTTTGTGGTTGTTGTTTAAATATATAG-3' y 5'-AAAAAAAAAATTCCTCCCCTTCC-3') (Bio-Rad Laboratories) y sondas fluorescentes que se unen a la secuencia metilada (FAM 5'-TGTAGAAGGATTTTGC GTTCGG-3') y a la no metilada (HEX 5'-TTGTAGAAG/ZEN/GATTTTGTGTGTTTGG-3'). Las condiciones de ddPCR en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización del ADN a 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 52°C durante 1 minuto para la amplificación, un ciclo a 98°C durante 10 minutos y finalmente se mantuvieron las muestras del producto de PCR a 4°C.

Tras la ddPCR, los resultados se recogieron mediante señales fluorescentes detectadas por los canales para sondas FAM (*SEPTINA9* metilado) y HEX (*SEPTINA9* no metilado) en un lector de placas de ddPCR QX200 (Bio-Rad Laboratories). Los datos fueron analizados con el software Quanta Soft v.1.7 (Bio-Rad Laboratories). Los resultados fueron recogidos mediante la concentración de copias metiladas y no metiladas del gen *SEPTINA9* (**Figura 1**).

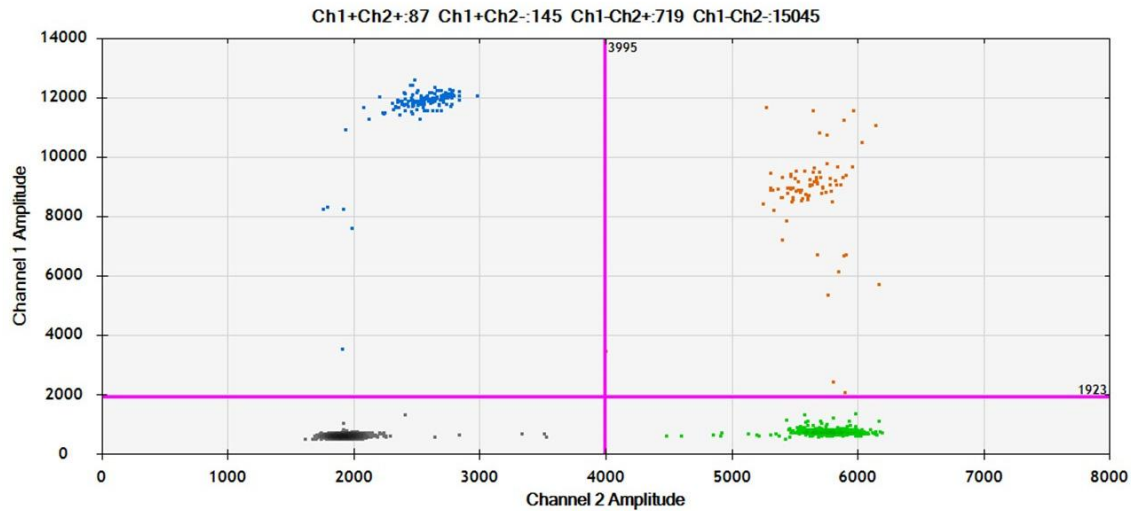


Figura 1. Ejemplo de análisis de mSEPT9 mediante ddPCR: *Azul*: gotas con gen SEPTINA9 metilado. *Naranja*: gotas con gen SEPTINA9 metilado + no metilado. *Verde*: gotas con gen SEPTINA9 no metilado. Negro: Control negativo.

Hemos observado en experimentos previos que el análisis del valor absoluto de los analitos de muestras de plasma global es muy variable como para obtener un resultado objetivamente evaluable. Por lo tanto, consideramos que la razón entre gen SEPTINA9 metilado y no metilado, que hemos denominado "ratio de metilación del gen SEPTINA9" (rmSEPT9), es más consistente y objetiva a la hora de interpretar los resultados.

Por lo tanto, la rmSEPT9 se calculó de la siguiente manera:

$$rmSEPT9 = \frac{\text{copias con gen SEPT9 metilado}}{\text{copias con gen SEPT9 no metilado}}$$

Aprobación ética y consentimiento informado

El presente estudio cumple los preceptos éticos de la Declaración de Helsinki y ha sido aprobado por el correspondiente Comité de Ética de la Investigación. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes en el momento del diagnóstico.

Resultados

Un total de 60 pacientes (61.7% hombres, 38.3% mujeres) fueron incluidos en el estudio. La edad media fue de 62.7 ± 11.2 años, con un rango de 38 a 81 años.

La mediana de tamaño tumoral fue 4.0 cm (RIC 3.5, 5.4), con un rango de 2 a 8.5 cm. En cuanto al estadio tumoral, 4 pacientes (6.7%) tenían un estadio T2, 46 pacientes (76.7%) tenían un estadio T3 y 10 pacientes (16.7%) un estadio T4. Un total de 4 pacientes (6.7%) tenían un estadio N0, 30 pacientes (50%) tenían un estadio N1 y 26 pacientes (43.3%) un estadio N2. La mediana de rmSEPT9 en el momento del diagnóstico fue de 0.024 (RIC 0.020, 0.034), con un rango de 0.008 a 0.4. (**Tabla 1**)

	Media $\pm$ DE	Rango
	Mediana (RIC)	
Edad (años)	62.7 $\pm$ 11.2	(38, 81)
Sexo		
Hombre	37 (61.7%)	
Mujer	23 (38.3%)	
Tamaño tumoral (cm)	4.0 (3.5, 5.4)	(2.0, 8.5)
Estadio T		
T1	0 (0%)	
T2	4 (6.7%)	
T3	46 (76.7%)	
T4	10 (16.7%)	

Estadio N		
N0	4 (6.7%)	
N1	30 (50%)	
N2	26 (43.3%)	
rmSEPT9	0.024 (0.020, 0.034)	(0.008, 0.4)

Tabla 1. Características demográficas y del tumor

Un total de 30 (50%) pacientes lograron una RCC y se incluyeron en un protocolo de WW. 8 (13.3%) pacientes no consiguieron alcanzar una RCC y fueron por tanto sometidos a cirugía, pero el análisis histopatológico de la pieza quirúrgica demostró ausencia de tumor residual, por lo que fueron considerados como respuesta tumoral completa (RTC) al demostrarse una respuesta patológica completa (RPC). De este modo, 38 (63.3%) pacientes en total obtuvieron una RTC a la TNT. Los 22 pacientes restantes (36.7%) no lograron una RCC y fueron sometidos a cirugía (bien radical o resección local), confirmándose la presencia de tumor residual. (**Tabla 2**)

RTC	RCC	30 (50%)	38 (63.3%)
	No RCC pero sí RPC	8 (13.3%)	
No RTC	No RCC ni RPC	22 (36.7%)	

Tabla 2. Respuesta tumoral a la TNT

Ambos grupos (pacientes con y sin RTC) fueron comparables en términos de sexo ($p=0.390$) y edad ($p=0.285$). Se observó un menor valor

estadísticamente significativo de rmSEPT9 en el grupo de pacientes que lograron un RTC a la TNT, en comparación con aquellos que no lograron una RTC (0.022 vs. 0.030, $p=0.006$), por lo que valores más altos de rmSEPT9 parecen asociarse con una menor probabilidad de RTC. También se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño tumoral (4.0 vs. 4.9 cm, $p=0.009$) y en el estadio tumoral T ($p=0.042$), pero no en el estadio N ($p=0.098$) entre pacientes con y sin RTC a TNT, de modo que un mayor tamaño y estadio tumoral T parecen asociarse con una menor probabilidad de RTC. (**Tabla 3**)

	RTC		<i>p</i>	OR (95% CI)
	No	Sí		
Edad (años)	60.7 ± 12.0	63.9 ± 10.7	0.285	1.03 (0.98, 1.08)
Sexo				
Hombre	12 (54.5%)	25 (65.8%)	0.390	
Mujer	10 (45.5%)	13 (34.2%)		
rmSEPT9	0.030 (0.023, 0.043)	0.022 (0.018, 0.030)	0.006	0.98 (0.96, 1.00)
Tamaño tumoral (cm)	4.9 (4.0, 6.2)	4.0 (3.1, 4.5)	0.009	0.56 (0.35, 0.84)
Estadio T				
T1	0 (0%)	0 (0%)	0.042	
T2	2 (9.1%)	2 (5.3%)		
T3	13 (59.1%)	33 (86.8%)		
T4	7 (31.8%)	3 (7.9%)		
Estadio N				
N0	0 (0%)	4 (10.5%)	0.098	

N1	9 (40.9%)	21 (55.3%)
N2	13 (59.1%)	13 (34.2%)

Tabla 3. Asociación entre edad, sexo, tamaño tumoral, estadio tumoral, rmSEPT9 y respuesta tumoral a la TNT

El rmSEPT9 presentó una correlación moderada y estadísticamente significativa con el tamaño tumoral (coeficiente de correlación de Spearman de 0.32, $p=0.016$) y el estadio N (coeficiente de correlación de Spearman de 0.29, $p=0.022$), y una correlación baja y estadísticamente no significativa con el estadio T (coeficiente de correlación de Spearman de 0.15, $p=0.256$).

(Tabla 4)

	Coef. Spearman	p
Tamaño	0.32	0.016
T	0.15	0.256
N	0.29	0.022

Tabla 4. Correlación entre rmSEPT9 y tamaño tumoral y estadio T y N

La probabilidad de obtener una RTC a la TNT en función de la rmSEPT9 y del tamaño tumoral fue explorada en un análisis de regresión logística. **(Figura 2) (Tabla 5)**

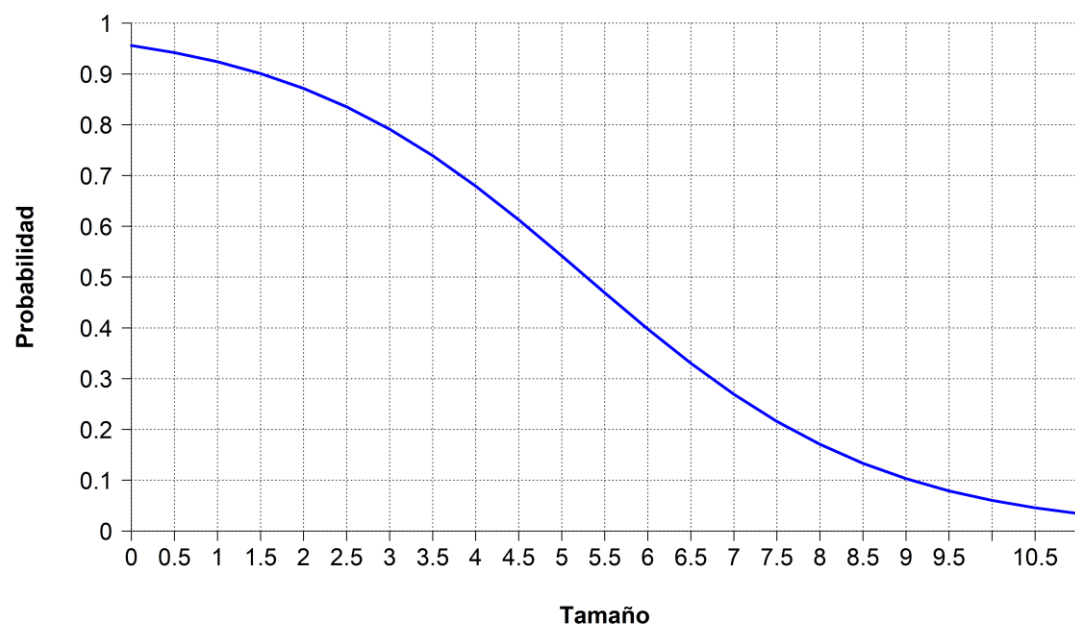
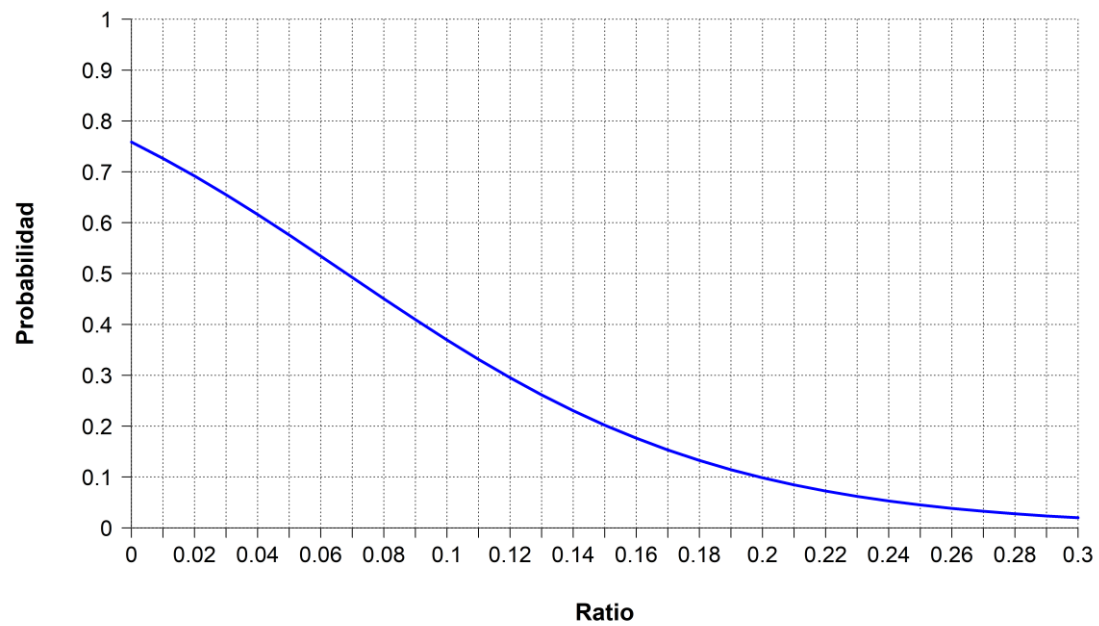


Figura 2. Curvas de regresión logística. Probabilidad de RTC a la TNT en función de rmSEPT9 (arriba) y tamaño tumoral en cm (abajo)

rmSEPT9	Probabilidad de RTC	Tamaño tumoral (cm)	Probabilidad de RTC
0.00	0.759	0.0	0.956
0.01	0.727	0.5	0.942
0.02	0.692	1.0	0.924
0.03	0.655	1.5	0.901
0.04	0.616	2.0	0.872
0.05	0.576	2.5	0.835
0.06	0.534	3.0	0.791
0.07	0.492	3.5	0.739
0.08	0.451	4.0	0.679
0.09	0.409	4.5	0.613
0.10	0.370	5.0	0.542
0.11	0.331	5.5	0.469
0.12	0.295	6.0	0.398
0.13	0.262	6.5	0.330
0.14	0.230	7.0	0.269
0.15	0.202	7.5	0.216
0.16	0.176	8.0	0.171
0.17	0.153	8.5	0.133
0.18	0.133	9.0	0.103
0.19	0.115	9.5	0.079
0.20	0.099	10.0	0.060
0.21	0.085	10.5	0.046
0.22	0.073	11.0	0.035
0.23	0.062		
0.24	0.053		

0.25	0.045	
0.26	0.038	
0.27	0.033	
0.28	0.028	
0.29	0.024	
0.30	0.020	

Tabla 5. *Análisis de regresión logística. Probabilidad de RTC a la TNT en función de rmSEPT9 y tamaño tumoral*

Discusión

El proceso de carcinogénesis en el ser humano no solo depende de cambios genéticos sino también de alteraciones epigenéticas como la metilación del ADN. De este modo, la hipermetilación aberrante en la región promotora de ciertos genes puede producir un silenciamiento génico inapropiado y conducir al desarrollo de cáncer. [9] *SEPTINA9* es un gen ubicado en el cromosoma 17q25 que codifica proteínas filamentosas involucradas en la formación de microtúbulos, la angiogénesis, la motilidad y la proliferación celular y el control del ciclo celular, entre otros. [9-11]

La hipermetilación del gen *SEPTINA9* es uno de los cambios epigenéticos más estudiados, dada su implicación en la carcinogénesis del CCR, [9,11] y un biomarcador validado para el diagnóstico y el seguimiento del CCR. Se han descrito una alta especificidad y valor predictivo negativo, y una sensibilidad moderada para la detección temprana del CCR. [5] Dada su significativa disminución tras la resección quirúrgica, [12,13] ha demostrado su utilidad como biomarcador de resección quirúrgica completa, [6] enfermedad mínima residual y recurrencia tumoral tras la cirugía en pacientes con CCR. [7,13] También ha sido propuesto como potencial biomarcador de la efectividad de la terapia antitumoral, ya que los niveles de mSEPT9 en plasma disminuyen 1.7 veces tras la quimioterapia y 2.3 veces tras la resección del CR. [14] Además, los niveles plasmáticos de mSEPT9 se correlacionan cuantitativamente con la carga tumoral y el pronóstico en términos de supervivencia en pacientes con CCR estadio IV. [15]

La respuesta tumoral a la neoadyuvancia constituye un factor pronóstico muy importante en pacientes con CRLA, [4] pero la predicción de esta respuesta tumoral a la TNT constituye una tarea difícil. Se han propuesto

múltiples marcadores, tanto antes como después de la quimiorradioterapia, con resultados variables: el análisis de expresión génica; los organoides; los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphisms*); la metilación del ADN; los microARNs; el ADN tumoral circulante (ctDNA, del inglés *circulating tumor DNA*); el antígeno carcinoembrionario (CEA, del inglés *carcinomembryonic antigen*); las células tumorales circulantes; el tamaño del tumor; el estadio T y N; la distancia del tumor desde el margen anal; la extensión circunferencial y la posición anterior del tumor; el *budding* intratumoral; el microambiente tumoral; la histología mucinosa; el grado de diferenciación tumoral; la ulceración macroscópica; el microbioma intestinal; la invasión linfovascular, perineural y la ausencia de necrosis tumoral; la ratio tumor-estroma; la ratio linfocitos-monocitos; el índice de masa corporal; los niveles de hemoglobina; el valor de captación estandarizado (SUV, del inglés *standardized uptake value*) del PET/TC; la radiómica; el tiempo transcurrido tras la quimiorradioterapia; las mutaciones de los genes *APC*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4*, *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*; el factor proapoptótico Bax; la proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP); el VEGF; el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1); la osteopontina; la mioferlina; el metabolismo de los ácidos grasos; citocinas como IL-1 e IL-8... [4,16–36] pero no se han desarrollado marcadores que consigan predecir de forma fiable la respuesta tumoral al TNT en pacientes con CRLA, ya que todos ellos presentan importantes limitaciones. [4]

Uno de los biomarcadores más empleados para el diagnóstico y el seguimiento del CCR es el CEA, ya que su elevación es considerada un fuerte marcador de recurrencia tumoral. [37] Sin embargo, no es un marcador específico del CCR, por lo que puede encontrarse elevado en presencia de

otras neoplasias digestivas y enfermedades inflamatorias, [37] y el 70% de los pacientes con CR tienen niveles negativos de CEA. [38] No obstante, las concentraciones bajas de CEA (≤ 5 ng/mL) se relacionaron con una mayor probabilidad de RCC a la quimiorradioterapia neoadyuvante en pacientes con CRLA en algunos estudios. [35]

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos biomarcadores que permitan resolver estas limitaciones y consigan predecir la respuesta tumoral a la TNT. Según nuestros resultados, la rmSEPT9 en cfDNA plasmático en el momento del diagnóstico se correlaciona significativamente con el tamaño del tumor y el estadio N, y es capaz de predecir la respuesta tumoral futura a la TNT, puesto que valores más altos de rmSEPT9 parecen predecir una menor probabilidad de RTC, y viceversa. De este modo, en función de la rmSEPT9 podemos identificar, en el momento del diagnóstico, aquellos pacientes que con mayor probabilidad conseguirán una RTC a la TNT, sirviendo como herramienta de apoyo en la toma de decisiones en el seno de una filosofía de decisiones compartidas con el paciente. En casos de respuesta clínica casi completa o ante la duda de si nos encontramos ante una RCC o no, una rmSEPT9 baja al diagnóstico puede inclinar la balanza hacia el seguimiento de estos pacientes, pues sabemos que la probabilidad de obtener una RTC es elevada, evitando cirugías innecesarias con una elevada morbilidad. Al contrario, una rmSEPT9 elevada al diagnóstico nos hará ser más cautos a la hora de asumir una supuesta RCC a la TNT.

El tamaño del tumor y el estadio T, pero no el estadio N, también se asocian con la respuesta tumoral a la TNT, de modo que tumores más grandes y estadios T más avanzados parecen predecir una menor probabilidad de RTC.

Un detalle importante a tener en cuenta es que no existen diferencias estadísticamente significativas en términos de edad entre ambos grupos (pacientes con y sin RTC), ya que la metilación del ADN es un fenómeno fisiológico que también aumenta con la edad. [39,40]

Una de las principales ventajas de la rmSEPT9 en comparación con otros tests comerciales de mSEPT9 es que aporta un valor cuantitativo, continuo, no dicotómico y relativo del nivel de mSEPT9 que además se puede monitorizar durante el tratamiento y seguimiento de los pacientes con CRLA.

Sin embargo, estos resultados deben tomarse con precaución debido al limitado tamaño muestral y deben ser validados en futuros estudios con mayor número de pacientes.

Durante el próximo año 2026 se planea analizar también muestras de plasma obtenidas:

- En el momento de la evaluación de la respuesta tumoral a la TNT.
- Al año de seguimiento o ante la sospecha de recrecimiento tumoral o metástasis a distancia.

Con el doble objetivo, respectivamente, de:

- Evaluar la utilidad de la variación de la rmSEPT9 como marcador de respuesta tumoral a la TNT. Nuestra hipótesis postula que aquellos pacientes con un mayor descenso de la rmSEPT9 entre la muestra al diagnóstico y la muestra de la evaluación de la respuesta presentarán con mayor probabilidad una RTC a la TNT.
- Evaluar la utilidad de la variación de la rmSEPT9 durante el seguimiento para la detección precoz del recrecimiento tumoral y las

metástasis a distancia. Nuestra hipótesis postula que aquellos pacientes con recrecimiento tumoral tras una RCC o metástasis a distancia durante el seguimiento presentarán una elevación significativa de la rmSEPT9 respecto a la muestra de la evaluación de la respuesta.

Conclusiones

La rmSEPT9 al diagnóstico se correlaciona significativamente con el tamaño del tumor, el estadio N y la probabilidad de obtener una RTC a la TNT en pacientes con CRLA. Constituye por lo tanto un valioso biomarcador para la predicción de la respuesta tumoral a la TNT.

Bibliografía

- [1] Colorectal Cancer: Statistics | Cancer.Net [Internet]. Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/statistics>
- [2] Kasi A, Abbasi S, Handa S, Al-Rajabi R, Saeed A, Baranda J, Sun W. Total Neoadjuvant Therapy vs Standard Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Netw Open. 2020 Dec 1;3(12):e2030097. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.30097
- [3] Kang SB, Cho JR, Jeong SY, Oh JH, Ahn S, Choi S, Kim DW, Lee BH, Youk EG, Park SC, Heo SC, Lee DS, Ryoo SB, Park JW, Park HC, Lee SM, Kang SI, Kim MH, Oh HK, Shin R, Kim MJ, Lee KH, Kim YH, Kim JS, Lee KW, Lee HS, Kim HJ, Park YS, Sohn DK, Park KJ; Seoul Colorectal Research Group (SECOG). Quality of life after sphincter preservation surgery or abdominoperineal resection for low rectal cancer (ASPIRE): A long-term prospective, multicentre, cohort study. Lancet Reg Health West Pac. 2020 Dec 28;6:100087. doi: 10.1016/j.lanwpc.2020.100087
- [4] Kokaine L, Gardovskis A, Gardovskis J. Evaluation and Predictive Factors of Complete Response in Rectal Cancer after Neoadjuvant Chemoradiation Therapy. Medicina (Kaunas). 2021 Sep 30;57(10):1044. doi: 10.3390/medicina57101044
- [5] Hariharan R, Jenkins M. Utility of the methylated SEPT9 test for the early detection of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. BMJ Open Gastroenterol. 2020 Feb 18;7(1):e000355. doi: 10.1136/bmjgast-2019-000355
- [6] Leon Arellano M, García-Arranz M, Ruiz R, Olivera R, Magallares S, Olmedillas-Lopez S, Valdes-Sanchez T, Guadalajara H, García-Olmo D. A First Step to a Biomarker of Curative Surgery in Colorectal Cancer by

- Liquid Biopsy of Methylated Septin 9 Gene. *Dis Markers*. 2020 Jun 5;2020:9761406. doi: 10.1155/2020/9761406
- [7] Leon Arellano M, García-Arranz M, Guadalajara H, Olivera-Salazar R, Valdes-Sanchez T, García-Olmo D. Analysis of Septin 9 Gene Hypermethylation as Follow-Up Biomarker of Colorectal Cancer Patients after Curative Surgery. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Apr 15;12(4):993. doi: 10.3390/diagnostics12040993
- [8] Patel UB, Taylor F, Blomqvist L, George C, Evans H, Tekkis P, Quirke P, Sebag-Montefiore D, Moran B, Heald R, Guthrie A, Bees N, Swift I, Pennert K, Brown G. Magnetic resonance imaging-detected tumor response for locally advanced rectal cancer predicts survival outcomes: MERCURY experience. *J Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3753-60. doi: 10.1200/JCO.2011.34.9068
- [9] Fukushige S, Horii A. DNA methylation in cancer: a gene silencing mechanism and the clinical potential of its biomarkers. *Tohoku J Exp Med*. 2013 Mar;229(3):173-85. doi: 10.1620/tjem.229.173. PMID: 23419314
- [10] Mostowy S, Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Feb 8;13(3):183-94. doi: 10.1038/nrm3284
- [11] Peterson EA, Petty EM. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin Genet*. 2010 Jun;77(6):511-24. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01392.x
- [12] Abd El Kader L, Soliman AH, Salem SE, Akel SY, Ibrahim NH. The Clinical Significance of Septin 9 and Colon Cancer Specific Antigen-2 (CCSA-2) in Colorectal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023 Mar 1;24(3):1027-1036. doi: 10.31557/APJCP.2023.24.3.1027

- [13] Ma ZY, Chan CSY, Lau KS, Ng L, Cheng YY, Leung WK. Application of droplet digital polymerase chain reaction of plasma methylated septin 9 on detection and early monitoring of colorectal cancer. *Sci Rep*. 2021 Dec 6;11(1):23446. doi: 10.1038/s41598-021-02879-8
- [14] Ponomaryova AA, Rykova EY, Solovyova AI, Tarasova AS, Kostromitsky DN, Dobrodeev AY, Afanasiev SA, Cherdyntseva NV. Dynamic Changes in Circulating Methylated Markers in Response to Antitumor Therapy of Rectal Cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2024 Sep;55(3):1190-1198. doi: 10.1007/s12029-024-01066-y
- [15] Liu W, Hu P, Liu J, Chen L. mSEPT9 Can Monitor the Response and Predict the Prognosis of Stage IV Colorectal Cancer Patients with Liver Metastasis Undergoing Potentially Curative Surgery. *J Surg Res*. 2021 Nov;267:485-494. doi: 10.1016/j.jss.2021.06.008
- [16] Empuku S, Nakajima K, Akagi T, Kaneko K, Hijiya N, Etoh T, Shiraishi N, Moriyama M, Inomata M. An 80-gene set to predict response to preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer by principle component analysis. *Mol Clin Oncol*. 2016 May;4(5):733-739. doi: 10.3892/mco.2016.806
- [17] Yao Y, Xu X, Yang L, Zhu J, Wan J, Shen L, Xia F, Fu G, Deng Y, Pan M, Guo Q, Gao X, Li Y, Rao X, Zhou Y, Liang L, Wang Y, Zhang J, Zhang H, Li G, Zhang L, Peng J, Cai S, Hu C, Gao J, Clevers H, Zhang Z, Hua G. Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell*. 2020 Jan 2;26(1):17-26.e6. doi: 10.1016/j.stem.2019.10.010
- [18] Timmerman C, Taveras LR, Huerta S. Clinical and molecular diagnosis of pathologic complete response in rectal cancer: an update. *Expert Rev*

- Mol Diagn. 2018 Oct;18(10):887-896. doi: 10.1080/14737159.2018.1514258
- [19] Dayde D, Tanaka I, Jain R, Tai MC, Taguchi A. Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 7;18(3):573. doi: 10.3390/ijms18030573
- [20] De Palma FDE, Luglio G, Tropeano FP, Pagano G, D'Armiento M, Kroemer G, Maiuri MC, De Palma GD. The Role of Micro-RNAs and Circulating Tumor Markers as Predictors of Response to Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 24;21(19):7040. doi: 10.3390/ijms21197040
- [21] Yi Y, Shen L, Shi W, Xia F, Zhang H, Wang Y, Zhang J, Wang Y, Sun X, Zhang Z, Zou W, Yang W, Zhang L, Zhu J, Goel A, Ma Y, Zhang Z. Gut Microbiome Components Predict Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer: A Prospective, Longitudinal Study. *Clin Cancer Res.* 2021 Mar 1;27(5):1329-1340. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3445
- [22] Patel PM, Harris K, Huerta S. Clinical and molecular diagnosis of pathologic complete response in rectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(11):1505-16. doi: 10.1586/14737159.2015.1091728
- [23] Bedrikovetski S, Traeger L, Vather R, Moore JW, Sammour T. Clinical and biochemical predictors of tumor response after neoadjuvant therapy in rectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2023 Jun;19(3):365-373. doi: 10.1111/ajco.13877
- [24] Yildirim E, Bektas S, Pelen Z, Yanik I, Er AM, Cengel F, Gumuskaya PÖ. Histopathological, Radiological, and Demographic Factors Predicting the

- Response to Neoadjuvant Therapy for Rectal Cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2022 Mar;53(1):22-30. doi: 10.1007/s12029-021-00697-9
- [25] Kim NK, Hur H. New Perspectives on Predictive Biomarkers of Tumor Response and Their Clinical Application in Preoperative Chemoradiation Therapy for Rectal Cancer. *Yonsei Med J*. 2015 Nov;56(6):1461-77. doi: 10.3349/ymj.2015.56.6.1461
- [26] Fowler H, Clifford RE, Bowden D, Sutton PA, Govindarajah N, Fok M, Glenn M, Wall M, Rubbi C, Buczacki SJA, Mandal A, Francies H, Hughes J, Parsons JL, Vimalachandran D. Myoferlin: A Potential Marker of Response to Radiation Therapy and Survival in Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2024 Nov 15;120(4):1111-1123. doi: 10.1016/j.ijrobp.2024.05.030
- [27] Wen X, Zee SY, Shroyer KR, Bandovic J. Intratumoral Budding and Tumor Microenvironment in Pretreatment Rectal Cancer Biopsies Predict the Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2022 Jan 1;30(1):1-7. doi: 10.1097/PAI.0000000000000966
- [28] Alden SL, Lee V, Narang AK, Meyer J, Gearhart SL, Christenson ES. Circulating Tumor DNA to Predict Radiographic and Pathologic Response to Total Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Oncologist*. 2024 Mar 4;29(3):e414-e418. doi: 10.1093/oncolo/oyad336
- [29] Zhou H, Chen Y, Xiao Y, Wu Q, Li H, Li Y, Su G, Ke L, Wu J, Li J. Evaluation of the ability of fatty acid metabolism signature to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy and prognosis of patients with locally advanced rectal cancer. *Front Immunol*. 2022 Nov 24;13:1050721. doi: 10.3389/fimmu.2022

- [30] Jeon SH, Song C, Chie EK, Kim B, Kim YH, Chang W, Lee YJ, Chung JH, Chung JB, Lee KW, Kang SB, Kim JS. Combining Radiomics and Blood Test Biomarkers to Predict the Response of Locally Advanced Rectal Cancer to Chemoradiation. *In Vivo*. 2020 Sep-Oct;34(5):2955-2965. doi: 10.21873/invivo.12126
- [31] Huang Y, Lee D, Young C. Predictors for complete pathological response for stage II and III rectal cancer following neoadjuvant therapy - A systematic review and meta-analysis. *Am J Surg*. 2020 Aug;220(2):300-308. doi: 10.1016/j.amjsurg.2020.01.001
- [32] Strous MTA, Faes TKE, Heemskerk J, Lohman BGPM, Simons PCG, Janssen Heijnen MLG, Vogelaar FJ, de Bruijne AP. Tumour-stroma ratio to predict pathological response to neo-adjuvant treatment in rectal cancer. *Surg Oncol*. 2022 Dec;45:101862. doi: 10.1016/j.suronc.2022.101862
- [33] Fischer J, Eglinton TW, Frizelle FA. Clinical predictors of response to chemoradiotherapy for rectal cancer as an aid to organ preservation. *ANZ J Surg*. 2021 Jun;91(6):1190-1195. doi: 10.1111/ans.16531
- [34] Chapman BC, Lai SH, Friedrich T, Lieu CH, Moskalenko M, Olsen JR, Herter W, Birnbaum EH, McCarter MD, Vogel JD. Rectal Cancer: Clinical and Molecular Predictors of a Complete Response to Total Neoadjuvant Therapy. *Dis Colon Rectum*. 2023 Apr 1;66(4):521-530. doi: 10.1097/DCR.0000000000002245
- [35] Xu YJ, Tao D, Qin SB, Xu XY, Yang KW, Xing ZX, Zhou JY, Jiao Y, Wang LL. Prediction of pathological complete response and prognosis in locally advanced rectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2024 Jun 15;16(6):2520-2530. doi: 10.4251/wjgo.v16.i6.2520

- [36] Yilmaz S, Liska D, Conces ML, Tursun N, Elamin D, Ozgur I, Maspero M, Rosen DR, Khorana AA, Balagamwala EH, Amarnath SR, Valente MA, Steele SR, Krishnamurthi SS, Gorgun E. What Predicts Complete Response to Total Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer? *Dis Colon Rectum*. 2025 Jan 1;68(1):60-68. doi: 10.1097/DCR.0000000000003395
- [37] Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 7;22(5):1745-55. doi: 10.3748/wjg.v22.i5.1745
- [38] Shen D, Wang X, Wang H, Xu G, Xie Y, Zhuang Z, Huang Z, Li J, Lin J, Wang P, Huang M, Luo Y, Yu H. Current Surveillance After Treatment is Not Sufficient for Patients With Rectal Cancer With Negative Baseline CEA. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022 Mar 1;20(6):653-662.e3. doi: 10.6004/jnccn.2021.7101
- [39] Mishra S, Raval M, Kachhawaha AS, Tiwari BS, Tiwari AK. Aging: Epigenetic modifications. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2023;197:171-209. doi: 10.1016/bs.pmbts.2023.02.002
- [40] Johnson AA, Akman K, Calimport SR, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhães JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res*. 2012 Oct;15(5):483-94. doi: 10.1089/rej.2012.1324