



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

# **Análisis y validación de los perfiles transcriptómicos de variantes histológicas del carcinoma colorrectal**

**Rosa Carbonell Muñoz**

**Tesis Doctoral**

**2015**



Los doctores Pablo Conesa Zamora, Doctor en Medicina, Especialista en Análisis Clínicos y Responsable del Grupo de Patología Molecular y Farmacogenética del Complejo Hospitalario de Cartagena, M<sup>a</sup> Carmen Turpín Sevilla, Investigadora del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Cartagena y profesora adjunta del Departamento de Biotecnología de la Universidad Francisco de Vitoria, y M<sup>a</sup> Isabel Martínez-Lacaci Fortuny, Investigadora de la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y profesora asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN que el presente trabajo de investigación titulado “Análisis y validación de los perfiles transcriptómicos de variantes histológicas del carcinoma colorrectal” ha sido realizado bajo su dirección por Rosa Carbonell Muñoz para obtener el grado de Doctora. La mayor parte de este trabajo se ha desarrollado en el Complejo Hospitalario de Cartagena, en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Murcia y en la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche, a 23 de Septiembre de 2015.

Los Directores de la Tesis:

**Fdo.: Pablo Conesa Zamora**

**Fdo.: M<sup>a</sup> Carmen Turpín Sevilla**

**Fdo.: M<sup>a</sup> Isabel Martínez-Lacaci Fortuny**





Antonio Ferrer Montiel, director del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche, da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral titulada “Análisis y validación de los perfiles transcriptómicos de variantes histológicas del carcinoma colorrectal”, presentada por doña Rosa Carbonell Muñoz.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado, en Elche, a 23 de Septiembre de 2015 .

El Director del Instituto de Biología Molecular y Celular:

**Fdo.: Prof. Antonio Ferrer Montiel**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Pablo Conesa Zamora , por su confianza, por darme la oportunidad y ofrecerme el entorno para el desarrollo de esta tesis. Muchísimas gracias por todo el tiempo dedicado durante estos años.

A la Dra. María del Carmen Turpín Sevilla por su implicación, por hacer de guía y aconsejarme en la elaboración y revisión de este trabajo. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme y a cualquier hora.

A la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Martínez-Lacaci Fortuny por todo el tiempo dedicado, por sus revisiones y sugerencias y por acogerme en su laboratorio.

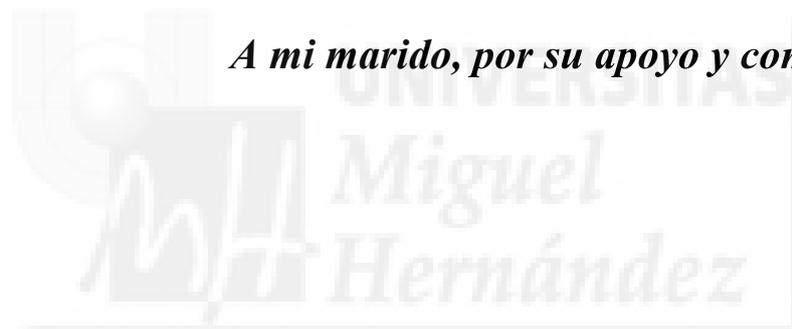
Al Dr. José García Solano por su disponibilidad para aclarar dudas, sus correcciones y por facilitarme toda la información necesaria.

A Daniel Torres Moreno por su trabajo y ayuda en el laboratorio.



*A mis padres, ejemplo de esfuerzo y sacrificio.*

*A mi marido, por su apoyo y comprensión.*





## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
ABREVIATURAS .....	13
RESUMEN .....	17
I. INTRODUCCIÓN.....	19
I.1 Epidemiología .....	21
I.2 Factores de riesgo y causas .....	24
I.3 Factores de riesgo no genéticos .....	26
I.4 Carcinomas .....	30
I.5 Adenomas .....	35
I.6 Alteraciones genéticas del carcinoma colorrectal .....	37
I.6.1 Activación de Oncogenes .....	38
I.6.1.1 Oncogén <i>KRAS</i> .....	38
I.6.1.2 Oncogén <i>BRAF</i> .....	39
I.6.1.3 Oncogén <i>PI3K</i> .....	40
I.6.2. Inactivación mutacional de genes supresores de tumores .....	42
I.6.2.1 El gen <i>APC</i> .....	42
I.6.2.2 El gen <i>TP53</i> .....	44
I.6.2.3 La vía supresora tumoral TGF- $\beta$ .....	45
I.6.3 Defectos en la reparación del ADN .....	47
I.7 Valor predictivo de las mutaciones <i>KRAS/BRAF</i> en terapia anti-EGFR .....	49
I.8 Rutas moleculares de carcinogénesis colorrectal .....	52
I.8.1 Vía de inestabilidad cromosómica o vía supresora .....	53
I.8.2 Vía de inestabilidad de microsatélites .....	53



IV.1.3 Expresión de Fascina1 en líneas celulares .....	128
IV.1.4 Análisis de la expresión por inmunohistoquímica .....	129
IV.2 Estudio comparativo entre CS y CCR hMSI-H .....	140
IV.2.1 Análisis por microarray .....	140
IV.2.1.1 Funciones diferencialmente expresadas .....	140
IV.2.1.2 Genes diferencialmente expresados .....	145
IV.2.1.3 Funciones celulares de los genes seleccionados .....	149
IV.2.2. Expresión por qPCR .....	150
IV.2.3. Expresión por inmunohistoquímica .....	154
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	159
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	181
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	185





## ÍNDICE DE FIGURAS

### Introducción

Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer colorrectal en distintas regiones del mundo.....	21
Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer España en hombres y mujeres .....	22
Figura 3. Incidencia cáncer colorrectal en Europa .....	23
Figura 4. Mortalidad por cáncer colorrectal en Europa. Tasa ajustada por años de defunción .....	23
Figura 5. Esquema de la secuencia adenoma-carcinoma adaptada y modificada de Jänne PA, Mayer RJ 2000 .....	25
Figura 6. Capas de la pared del colon .....	28
Figura 7. Adenoma serrado sésil .....	35
Figura 8. Vía de señalización de RAS .....	40
Figura 9. Vía de señalización del gen PI3K .....	42
Figura 10. Esquema de la vía de señalización del TGF-B .....	46
Figura 11. Esquema de la vía de transducción de señal asociada con la TEM. ....	47
Figura 12. Sistema de reparación MMR .....	48
Figura 13. Esquema de señalización mediada por el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) .....	50

### Materiales y Métodos

Figura 1. Ejemplo tipo de resultados para un ensayo de PCR cuantitativa .....	81
Figura 2. A. Principio del ensayo de PCR cuantitativa con SYBRgreen .....	82
Figura 2. B. Ejemplo de curva de disociación que permite comprobar que únicamente se ha obtenido un producto de amplificación .....	82

## Resultados

Figura 1. Red de rutas KEGG seleccionadas por estar diferencialmente representadas en CS respecto a CC .....	100
Figura 2 . Electroforesis de los productos de la qPCR para <i>RHOA</i> , <i>RHOC</i> , <i>CDC42</i> , <i>RHOV</i> , <i>RAC3</i> , y $\beta$ <i>ACTINA</i> .....	106
Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de la qPCR de <i>FSCN1</i> y $\beta$ -actina. En el gel de la izquierda se muestra el amplicón de <i>FSCN1</i> que se obtiene con los cebadores 129F y 130R y en el de la derecha el obtenido con los 115F y 116R ...	122
Figura 4 . Electroforesis de los productos de la qPCR de <i>HPCA</i> y <i>DAG1</i> .....	122
Figura 5. Expresión de Fascina1 y $\beta$ -actina en las líneas celulares SW620, SW480, HCT116, LS174T, HT-29, LoVo, HCT-15, , HGUE-C-1, CACO2 y DLD-1 .....	128
Figura 6. Expresión de Fascina1 por inmunohistoquímica en (A) CS, (B) CC y (C) CCR hMSI-H. Ampliación 20x .....	131
Figura 7. Expresión de Hipocalcina por inmunohistoquímica en (A) CS, (B) CC y (C) CCR hMSI-H. Ampliación 20x excepto para CS que es 40x .....	132
Figura 8. Expresión de NAIP por inmunohistoquímica en (A) CS, (B) CC y (C) CCR hMSI-H. Ampliación 20x .....	133
Figura 9. Curvas de Kaplan-Meier para Fascina1 con seguimiento a 60 meses .....	138
Figura 10. Curvas de Kaplan-Meier para Hipocalcina con seguimiento a 60 meses ..	139
Figura 11. Curvas de Kaplan-Meier para $\beta$ -dístroglicano con seguimiento a 60 meses .....	139
Figura 12. Procesamiento y presentación antigénico .....	141
Figura 13. Ruta de señalización quimioquina .....	141
Figura 14. Ruta de señalización receptor de interacción citoquina-citoquina .....	142
Figura 15. Ruta de señalización del receptor tipo Toll .....	142

Figura 16. Proteínas relacionadas con el CCR y rutas KEGG diferencialmente expresadas entre hMSI-H (en azul) y SC (en rojo) .....	143
Figura 17 . Electroforesis de los productos de la qPCR de <i>CRCP</i> , <i>ICAM-1</i> , <i>CXCL14</i> y <i>CSF3R</i> .....	150
Figura 18. Expresión de CRCP por inmunohistoquímica en CCR hMSI-H .....	155
Figura 19. Expresión de CRCP por inmunohistoquímica en CS .....	155
Figura 20. Expresión de ICAM-1 por inmunohistoquímica en CCR hMSI-H X20 ...	156
Figura 21. Expresión de ICAM-1 por inmunohistoquímica en CS X40 .....	156
Figura 22. Expresión de CXCL14 por inmunohistoquímica en CCR hMSI-H X20 ..	157
Figura 23. Expresión de CXCL14por inmunohistoquímica en CS X20 .....	157





## ÍNDICE DE TABLAS

### Introducción

Tabla 1. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal esporádico .....	26
Tabla 2. Sistema de clasificación TNM .....	29
Tabla 3. Comparación de la etapa AJCC/TNM con el sistema de clasificación, Dukes y Astler-Coller .....	29
Tabla 4. Clasificación molecular del CCR .....	63

### Materiales y Métodos

Tabla 1. Características demográficas y patológicas de los casos estudiados por microarray entre CS y CC y entre CS y CCR hMSI-H .....	74
Tabla 2. Cebadores utilizados en las PCRs .....	78
Tabla 3. Características demográficas y patológicas de los casos estudiados para la validación mediante qPCR de los genes <i>RHOA</i> , <i>RHOC</i> , <i>RHOV</i> , <i>CDC42</i> y <i>RAC3</i> entre CS y CC y Fascina1, Hipocalcina, $\beta$ -Distroglicano entre CS y CC .....	83
Tabla 4. Características demográficas y patológicas de los casos utilizados para la qPCR de los genes <i>RHOA</i> , <i>RHOC</i> , <i>RHOV</i> , <i>CDC42</i> y <i>RAC3</i> entre CS y CCR hMSI-H y <i>CXCL14</i> , <i>CSF3R</i> , <i>CRCP</i> y <i>ICAM1</i> entre CS y hMSI-H .....	85
Tabla 5. Características demográficas y patológicas de los casos utilizados en la inmunohistoquímica para Fascina1, Hipocalcina y $\beta$ -Distroglicano (CS y CC), y para <i>CRCP</i> , <i>CXCL14</i> e <i>ICAM1</i> (CS y CCR hMSI-H) .....	86
Tabla 6. Información sobre anticuerpos, equipamiento y procedimientos inmunohistoquímicos de Fascina1, Hipocalcina, $\beta$ -Distroglicano y NAIP .....	87
Tabla 7. Información sobre anticuerpos, equipamiento y procedimientos inmunohistoquímicos de ICAM1, CRCP y CXCL14 .....	88
Tabla 8. Componentes del gel concentrador y del gel separador .....	90

Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot .....	93
--	----

## **Resultados**

Tabla 1. Muestra los ARNms diferencialmente expresados entre CS y CC obtenidos de los perfiles moleculares para los que se conoce el nombre del gen .....	102
Tabla 2. Resultados qPCR al comparar muestras CC tumorales y CS tumorales.....	107
Tabla 3. Resultados qPCR al comparar muestras tumorales (CC y CS) con normales (CC y CS) .....	108
Tabla 4. Resultados qPCR al comparar muestras CC tumorales y CC normales .....	109
Tabla 5. Resultados qPCR al comparar muestras CS normales y CS tumorales .....	110
Tabla 6. Resultados qPCR al comparar muestras CS normales y CC normales .....	111
Tabla 7. Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H tumorales y CC tumorales .....	112
Tabla 8. Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H tumorales y CS tumorales .....	113
Tabla 9. Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian todos los casos (CSn, CSt, CCn, CCt, CCR hMSI-H) .....	114
Tabla 10. Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian todas las muestras tumorales (CC, CS y CCR hMSI-H) .....	115
Tabla 11. Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las muestras CC tumorales .....	116

Tabla 12. Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las muestras CS tumorales .....	117
Tabla 13. Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las muestras hMSI-H tumorales .....	118
Tabla 14. Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las todas las muestras normales (CC y CS) .....	119
Tabla 15. Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las todas las muestras CC normales .....	120
Tabla 16. Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las todas las muestras CS normales .....	121
Tabla 17. La tabla muestra la media de ARNm por copia de $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney para comparar muestras CC tumorales y CS tumorales .....	123
Tabla 18. La tabla muestra la media de ARNm por copia de $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney para comparar muestras CC y CS tumorales con CC y CS normales .....	124
Tabla 19. Resultados qPCR al comparar muestras CC normales y CC tumorales .....	125
Tabla 20. Resultados qPCR al comparar muestras CC normales y CS normales .....	126

Tabla 21. Resultados qPCR al comparar muestras CS normales y CS tumorales .....	127
Tabla 22. Expresión de Fascina1 en líneas celulares.....	129
Tabla 23. Validación inmunohistoquímica de los marcadores seleccionados en CS, CC y CCR hMSI-H .....	130
Tabla 24. Relación entre la expresión de Hipocalcina y NAIP en CS, CC y CCR hMSI-H .....	134
Tabla 25. Representación de las características de Fascina1, Hipocalcina y $\beta$ -Distroglicano para el diagnóstico diferencial entre CC y CS .....	136
Tabla 26. Representación de las características de Fascina1, Hipocalcina y $\beta$ -distroglicano para el diagnóstico diferencial entre CS y hMSI-H .....	137
Tabla 27. Muestra los ARNms más diferencialmente expresados entre hMSI-H CCR y CS obtenidos de los perfiles moleculares para los que se conoce el nombre del gen...148	
Tabla 28. Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H tumorales y CS normales .....	151
Tabla 29. Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H tumorales y CCR hMSI-H normales .....	152
Tabla 30. Resultados qPCR al comparar muestras CS tumorales y CS normales .....	153
Tabla 31. Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H y CS tumorales con CCR hMSI-H y CS normales .....	154
Tabla 32. Relación de la expresión de CRCP, CXCL14 e ICAM-1 en CS y CCR hMSI-H .....	158

## **ABREVIATURAS**

**AM:** Adrenomedulina

**AM2/ intermedin:** Adrenomedulina 2

**APC:** Adenomatous Polyposis Coli

**ASS:** Adenoma serrado sésil

**AST:** Adenoma serrado tradicional

**AT:** Adenoma Tubular

**ATCC:** American Type Culture Collection

**ATV:** Adenoma Tubuloveloso

**AV:** Adenoma Velloso

**BRAF:** B-type rapidly accelerated fibrosarcoma

**BRAK:** Quimiocina de mama y riñón

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**c-Myc:** Cellular homolog of the retroviral v-myc oncogene

**CC:** Adenocarcinoma convencional

**CCHNP:** Carcinoma colorrectal hereditario no polipósico

**CCR:** Cáncer colorrectal

**CIMP-H:** Hipermetilación de regiones promotoras en los genes de alto gado

**CIMP:** Hipermetilación de regiones promotoras en los genes

**CIN:** Inestabilidad cromosómica

**CS:** Adenocarcinoma serrado

**CSF3R:** Receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos

**CTL:** Linfocitos T citotóxicos

**CTLA-4:** Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

**DAB:** 3,3'-diamino-benzidina

**DCC:** Deleted in Colorectal Carcinoma

**DTT:** Dithiothreitol

**EGFR:** Receptor de factor de crecimiento epidérmico

**EMA:** Agencia Europea del Medicamento

**FAP:** Familiar adenomatous polyposis poliposis adenomatosa familiar

**FDA:** Food and Drug Administration

**FOXC 1:** Forkhead Box C1

**GAPs:** Proteínas activadoras de GTPasa

**GDI:** Proteínas inhibidoras de la disociación de nucleótidos de guanina

**GDP:** Guanosindifosfato

**GEFs:** Factores de cambio de nucleótidos de guanina

**GO:** Gene Ontology

**GSA:** Gene Set Enrichment Analysis

**GSK3B:** Glycogen synthase kinase 3 beta

**GTP:** Guanosintrifosfato

**hMSI-H:** Con alta inestabilidad de microsatélites y criterios histológicos de MSI-H

**ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular-1

**ILC:** Infiltrado linfoide de tipo Crohn-like

**KEGG:** Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto

**LFA-1:** Leucocitos asociado al antígeno-1

**LOH:** Alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad

**MAPK :** Proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MGMT:** 06-metilguanina-ADN metiltransferasa

**MLH1:** MutL homolog 1

**MMP:** Matrix metalloproteinase, Metaloproteínasa de matriz

**MMR:** Mismatch repair

**MSH2:** MutS protein homolog 2

**MSI-H:** Alta inestabilidad de microsatélites

**MSI-L:** Niveles bajos de inestabilidad

**MSI:** Inestabilidad de microsatélites

**MSS:** Estables para microsatélites

**MYH:** Human MutYhomolog DNA glycosylase

**NK:** Células asesinas naturales

**NO:** Óxido nítrico

**N-WASP:** Wiskott-Aldrich Neural

**OCT:** Optimal Cutting Temperatura

**PB:** Pares de bases

**PD-1:** Proteína de muerte programada 1

**PH:** Pólipo hiperplásico

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 quinasa

**PI3KCA:** Fosfatidilinositol-4-5-bifosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa

**PSA:** Persulfato amónico

**PTEN:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**Rho-ROCK:** Rho-associated serine-threonine protein kinase

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrilamide Gel Electrophoresis

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SMAD:** Drosophila 'mothers against decapentaplegic'

**STR:** Short tandem repeat

**TEM:** Transición epitelio mesénquima

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletileno diamina

**TGF- $\beta$** : Transforming growth factor beta, factor de crecimiento transformante beta

**TGFR**: Receptor del factor de crecimiento transformante

**TME**: Transición mesénquima epitelio

**TWIST 1**: Twist family bHLH transcription 1

**VEGF**: Factor de crecimiento del endotelio vascular

**VIM**: Vimentin

**WNT**: Wingless-type



## RESUMEN

El carcinoma tipo serrado (CS) es un subtipo de carcinoma colorrectal (CCR) recientemente reconocido por la OMS. Presenta un fenotipo más agresivo y un peor pronóstico, por lo que es importante disponer de marcadores que nos permitan diagnosticarlo correctamente. Tanto CS como el CCR hMSI-H (con alta inestabilidad de microsatélites y criterios histológicos de MSI-H) han sido propuestos como punto final de la vía del pólipo serrado.

Con el fin de valorar las posibles funciones y genes diferenciales en estos dos subtipos histológicos de CCR y buscar marcadores moleculares e histológicos que nos faciliten identificar con que tipo de tumor nos encontramos, se realizaron dos estudios por microarrays de perfiles de expresión génica entre el CS y el adenocarcinoma convencional (CC), y entre CS y CCR hMSI-H. Tras el análisis de los datos se seleccionaron genes diferencialmente expresados para validar su expresión diferencial a nivel de RNAm mediante PCR cuantitativa y a nivel de proteína mediante inmunohistoquímica.

Comparado con el CC, el CS presenta expresión diferencial de determinadas funciones como el citoesqueleto y la apoptosis y una desregulación en la función de las GTPasas que parece relacionarse significativamente con el desarrollo del CCR de forma general y comportarse de forma distinta entre ambos tipos de CCR. Se ha identificado a Fascina1 e Hipocalcina como marcadores diagnósticos útiles del CS. De la comparación de CS con CCR hMSI-H destaca la expresión diferencial de funciones relacionadas con la respuesta inmunológica, que podrían explicar los hallazgos clinicopatológicos observados para el CS en cuanto a la capacidad de éste para evitar el sistema inmune. La mayor expresión de *ICAM1* en hMSI-H tumoral podría contribuir al desarrollo de una mejor respuesta inmune en este tipo de tumor.



## I. INTRODUCCIÓN



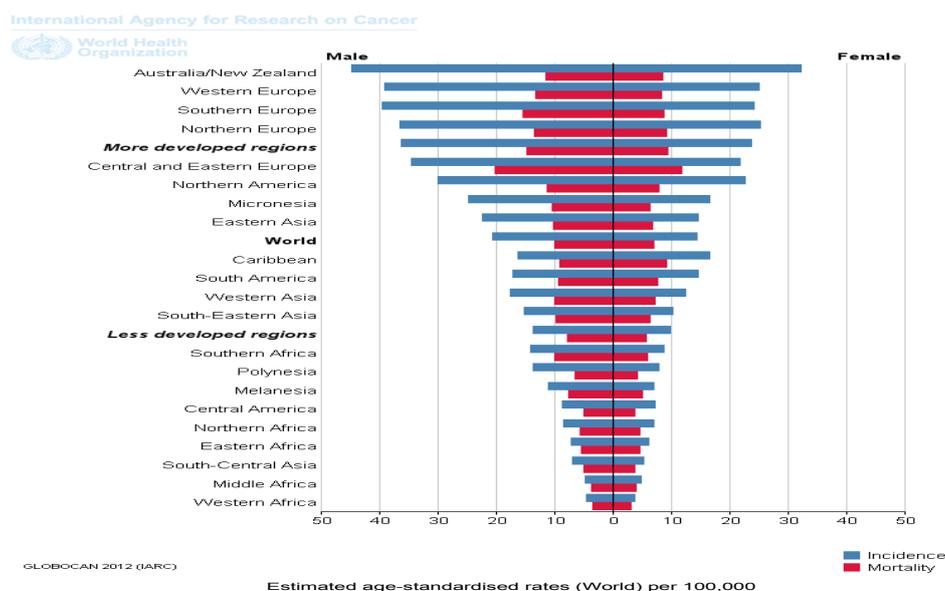


# I. INTRODUCCIÓN

## I.1. Epidemiología

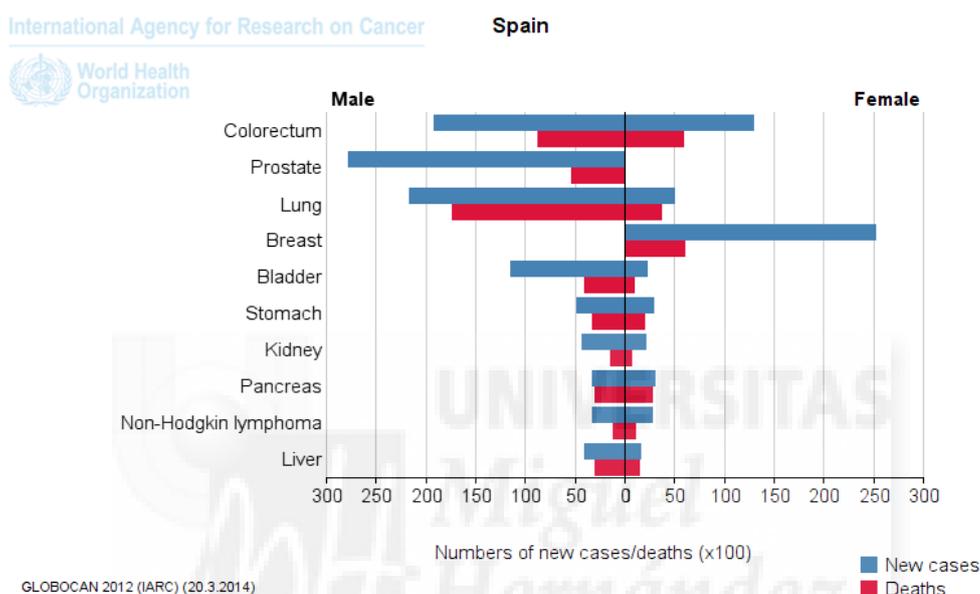
Durante los últimos años está aumentando la incidencia de cáncer suponiendo un importante problema de salud pública con 8.2 millones de muertes en 2012 en el mundo, 14.1 millones de nuevos casos y 32.6 millones de personas afectadas (en un plazo de cinco años después del diagnóstico).

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera causa mundial de cáncer más común en hombres (746.000 casos, 10% del total) y la segunda en mujeres (614.000 casos, 9.2% del total). Casi el 55% de los casos ocurre en países desarrollados. Hay una amplia variación en cuanto a incidencia por todo el mundo y los patrones geográficos son muy similares en hombres y mujeres: los ratios de incidencia varían en diez puntos en ambos sexos alrededor del mundo (Figura 1). El mayor ratio estimado se encuentra en los países de Australia /Nueva Zelanda (44.8 y 32.2 por 100.000 en hombres y mujeres respectivamente) y el menor se sitúa en el oeste de África (4.5 y 3.8 por 100.000).



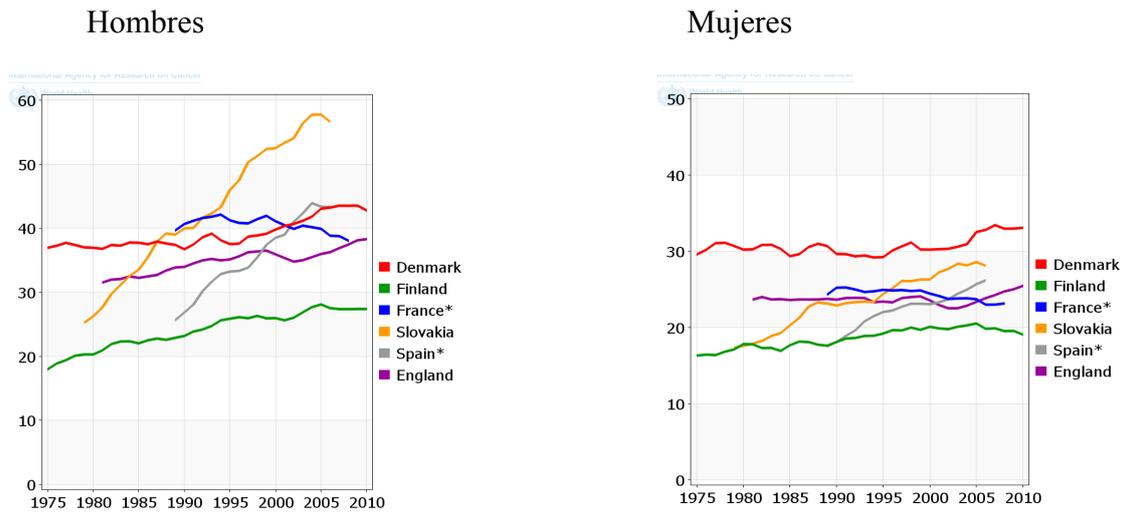
**Figura 1.** Incidencia y mortalidad por cáncer colorrectal en distintas regiones del mundo (globocan.iarc.f).

En España, el CCR ocupa el tercer lugar (15%) en cuanto a incidencia en hombres, tras el cáncer de próstata (21%) y de pulmón (16.9%) y el segundo lugar (15.2%) en mujeres, tras el cáncer de mama (29%) (Figura 2). Es la segunda causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos (**Globocan 2012**).



**Figura 2.** Incidencia y mortalidad por cáncer España en hombres y mujeres (*globocan.iarc.f*).

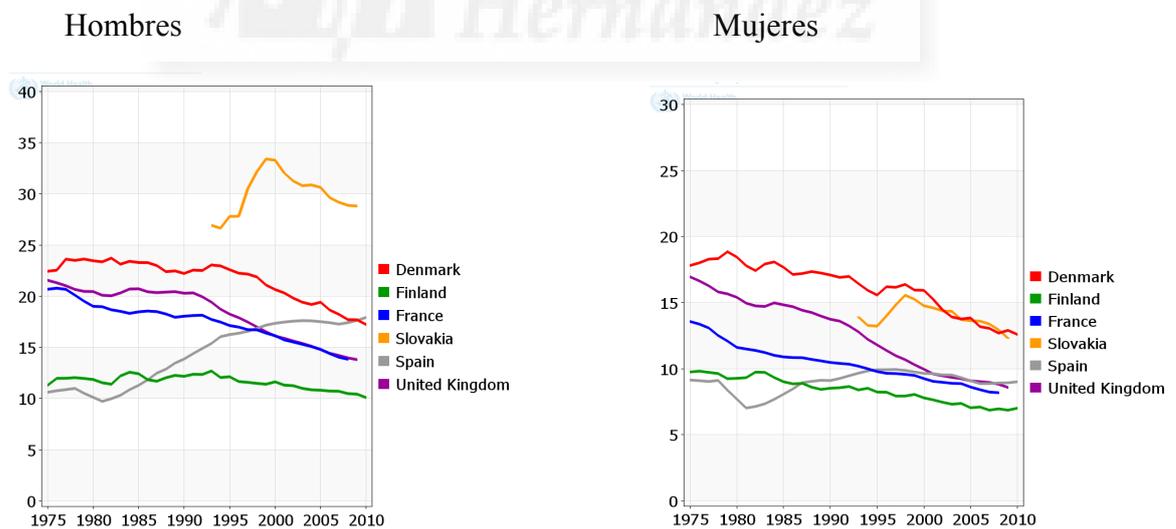
Se observa un aumento en la incidencia del CCR en los últimos años. La incidencia en España es menor que las de Dinamarca y Eslovaquia, pero mayor que la de Finlandia, Francia y Reino Unido (**Globocan 2012**).



\*Regional data

**Figura 3. Incidencia cáncer colorrectal en Europa (globocan.iarc.f).**

Destaca el aumento de la mortalidad por CCR en España mientras en otros países Europeos se observa un descenso de la mortalidad.



**Figura 4. Mortalidad por cáncer colorrectal en Europa. Tasa ajustada por años de defunción (globocan.iarc.f).**

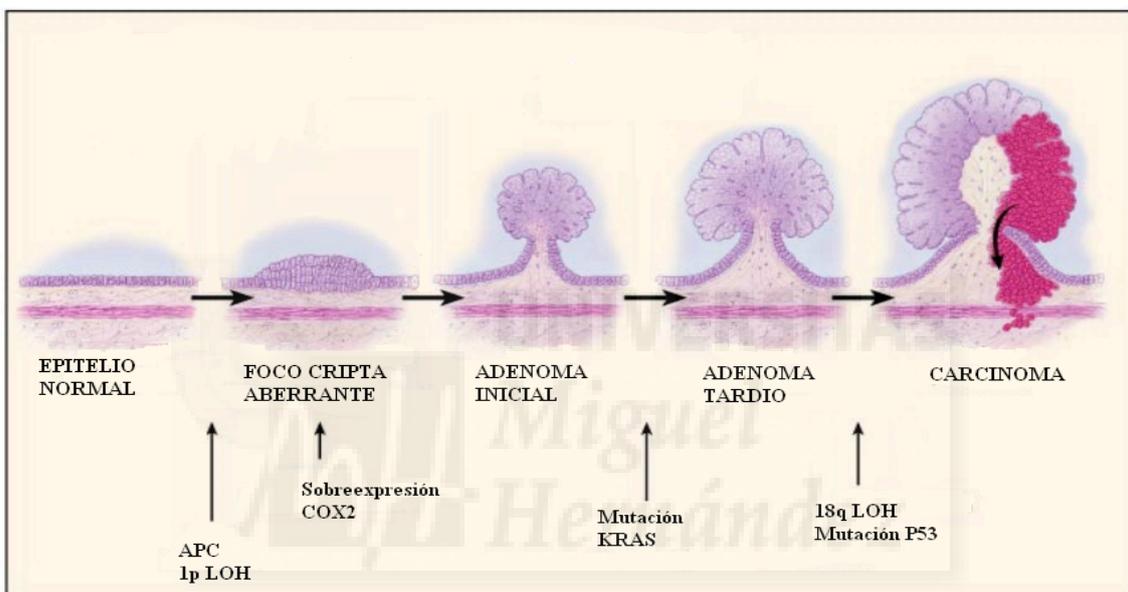
## I.2. Factores de riesgo y causas

Desde el punto de vista etiológico, el CCR puede clasificarse como hereditario y esporádico. Cerca del 80% de los casos de CCR ocurren de forma esporádica y el 20% restante se relacionan con la historia familiar. Mutaciones germinales en los genes *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) , *MLH1* (mutL homolog 1) y *MSH2* (MutS protein homolog 2) son de alta penetrancia y predisponen a la aparición del CCR de tipo hereditario. La base molecular más común de estas neoplasias es la mutación germinal en el gen *APC*, que origina la poliposis adenomatosa familiar (FAP, por las siglas en inglés de *familial adenomatous polyposis*) y en *MLH1* y *MSH2* para el cáncer colorrectal no polipósico hereditario (CCHNP) (Markowitz SD y Bertagnolli MM, 2009).

La FAP es una enfermedad autosómica dominante. Cerca del 80% de los individuos afectados se debe por mutación germinal en el gen *APC*. Un subconjunto de afectados por FAP y FAP atenuada tienen mutaciones bialélicas del gen *MYH* (human MutYhomolog DNA glycosylase). Estos pacientes pueden desarrollar más de 100 adenomas colorrectales (un 50 % de pacientes con 15 años, y el 95% de los pacientes con 35 años); si no se trata, el riesgo de CCR alcanza casi el 100% a los 40 años. CCHNP es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones germinales de los genes *Mismatch repair* (*MMR*). Tienen características de inestabilidad de microsatélites que ayudan a su diagnóstico. La penetrancia de CCR en CCHNP es del 70-80%. Presentan un riesgo incrementado de tumores del aparato genitourinario, estómago, sistema biliar, páncreas e intestino delgado. Por término medio, los pacientes desarrollan CCR a los 44 años, los tumores tienden a localizarse en el lado derecho, y

tienen características histológicas específicas que permiten sugerir este tipo de CCR (Weitz J et al, 2005).

Varios síndromes de poliposis hamartomatosas se asocian con un riesgo incrementado de cáncer al igual que el Síndrome de PeutzJeghers, Síndrome de poliposis juvenil, y Síndrome de Cowden (Weitz J et al, 2005).



*Figura 5. Esquema de la secuencia adenoma-carcinoma adaptada y modificada de Jänne PA, Mayer RJ 2000.*

En el CCR esporádico son necesarias al menos siete alteraciones genéticas diferentes para que ocurra la transformación hacia el fenotipo tumoral (Figura 5).

### I.3. Factores de riesgo no genéticos

Los principales factores de riesgo para la aparición de tumores esporádicos son de tipo ambiental. Entre los factores de riesgo evitables encontramos el consumo de tabaco y alcohol. Los factores de riesgo nutricionales juegan un papel importante en el desarrollo de CCR. Las carnes rojas o procesadas, especialmente cuando se cocinan a altas temperaturas deben limitarse y pueden reemplazarse por pescado y carne blanca. Dietas ricas en ácidos omega 3, fibra, folato, vitamina D, calcio y polifenoles puede proteger contra el CCR y la formación de adenomas (Tabla 1) (Weitz J et al, 2005).

La mayor parte de los CCR se originan en lesiones premalignas de la mucosa llamadas adenomas. Más del 70% de CCR se desarrollan a través de mutaciones esporádicas en pólipos adenomatosos, el 5% por tendencia a la afectación familiar y aproximadamente el 2% se desarrollan en pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria crónica.

FACTORES DE RIESGO
<b>Cáncer colorrectal esporádico:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>● Edad avanzada</li><li>● Sexo masculino</li><li>● Colectomía</li><li>● Colitis ulcerosa</li><li>● Factores Hormonales:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Nuliparidad, edad tardía en el primer embarazo, menopausia precoz</li></ul></li></ul>
<b>Factores ambientales</b> <ul style="list-style-type: none"><li>● Dieta rica en carne, grasas y pobre en fibra, folato y calcio</li><li>● Vida sedentaria</li><li>● Obesidad</li><li>● Diabetes mellitus</li><li>● Tabaco</li><li>● Radiación previa</li><li>● Alta ingesta de alcohol</li></ul>

**Tabla 1.** Factores de riesgo para el cáncer colorrectal esporádico. Traducido de Weitz J et al.

2005

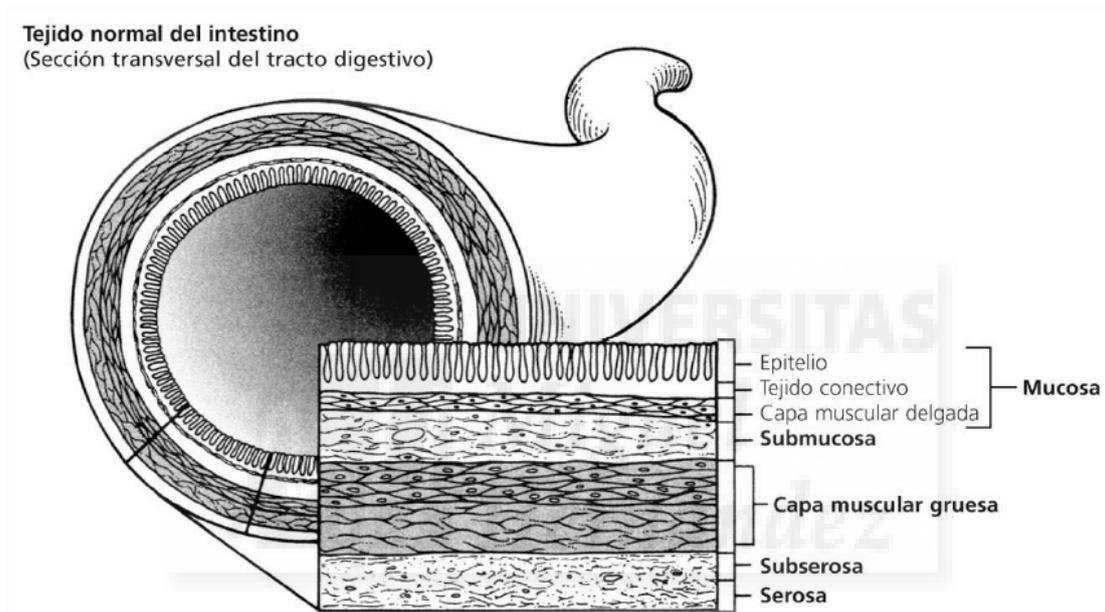
## Clasificación del estadio

La etapa (estadio) describe la extensión del cáncer en el cuerpo. Se basa en cuán lejos el cáncer ha crecido hacia la pared del intestino, si ha alcanzado o no las estructuras cercanas, o si se ha propagado o no a los ganglios linfáticos o a órganos distantes. El estadio de un cáncer es uno de los factores más importantes para determinar el pronóstico y las opciones de tratamiento.

Actualmente el sistema de clasificación por etapas del cáncer colorrectal utilizado es el que proporciona el American Joint Committee on Cancer (AJCC), también conocido como sistema TNM. Otros sistemas de clasificación más antiguos para el cáncer colorrectal, son el sistema Dukes y el sistema Astler-Coller. El sistema TNM describe tres piezas clave de información:

- La letra T describe la extensión de la propagación a través de las capas que forman la pared del colon y del recto. Estas capas, de la interior a la exterior, incluyen (Figura 6):
  - El revestimiento interno (mucosa).
  - Una capa muscular delgada (*muscularis mucosae*).
  - El tejido fibroso que se encuentra debajo de esta capa muscular (*submucosa*).
  - Una capa gruesa de músculo (*muscularis propria*) que se contrae para forzar el movimiento del contenido de los intestinos.
  - La capa delgada más externa de tejido conectivo (la subserosa y la serosa) que cubre la mayor parte del colon, pero no el recto.
- La N describe la extensión de la propagación a los ganglios o nódulos linfáticos adyacentes (regionales).
- La M indica si el cáncer se ha propagado a otros órganos del cuerpo.

Los números o las letras que aparecen después de la T, N y M proveen más detalles acerca de cada uno de estos factores. Los números del 0 a 4 indican la gravedad en forma creciente. La letra X significa "no puede ser evaluado porque la información no está disponible" (Tabla 2). La tabla 3 compara la etapa AJCC/TNM con los otros sistemas de clasificación, Dukes y Astler-Coller, que no son tan precisos.



**Figura 6.** Capas de la pared del colon. Imagen de American Cancer society ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

DEFINICIÓN DE TNM	
Tumor primario (T)	
TX	Tumor primario que no puede ser valorado
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invade lámina propia*
T1	Tumor que invade submucosa
T2	Tumor que invade musculares propia
T3	Tumor que invade muscularis propia, dentro de subserosa o de tejidos perirrectales o pericólicos no peritoneales
T4	Tumor que invade directamente otros órganos o estructuras, y/o perfora peritoneo visceral**, ***
*Nota: Tis incluye células cancerosas confinadas dentro de la membrana basal glandular (intraepitelial) o lámina propia (intramucosa) sin extensión a muscularis mucosae dentro de submucosa.	
**Nota: Invasión directa en T4 incluye invasión de otros segmentos del colon y recto por dentro de la serosa; por ejemplo, invasión del colon sigmoidees por un carcinoma del ciego.	
*** El tumor que se adhiere a otros órganos o estructuras, microscópicamente, es considerado T4	
Ganglios Linfáticos Regionales (N)	
NX	Ganglios linfáticos regionales que no pueden ser valorados
NO	No metástasis de ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis de 1 a 3 ganglios linfáticos regionales
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
Metástasis Distantes (M)	
MX	Metástasis a distancia que no pueden ser valoradas
MO	No metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia.

**Tabla 2.** Sistema de clasificación TNM: identifica por separado la profundidad de invasión del tumor, el estado de los ganglios linfáticos regionales y la presencia de metástasis a distancia. (Tabla tomada de [www.intramed.net](http://www.intramed.net))

ESTADIOS					
AJCC / UICC				DUKES	MAC*
Estadio 0	Tis	NO	M0	---	---
Estadio I	T1	NO	M0	A	A
	T2	NO	M0	A	B1
Estadio IIA	T3	NO	M0	B	B2
Estadio IIB	T4	NO	M0	B	B3
Estadio IIIA	T1-T2	N1	M0	C	C1
Estadio IIIB	T3-T4	N1	M0	C	C2/C3
Estadio IIIC	Cualquier T	N2	M0	C	C1/C2/C3
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	---	D
*MAC: clasificación Astler-Coller modificada.					
GRADO HISTOLOGICO (G)			TUMOR RESIDUAL (R)		
GX	No puede ser valorado		RO: Resección completa, márgenes negativos histológicamente, no residuo tumoral después de la resección.		
G1	Bien diferenciado		R1: Resección incompleta, márgenes comprometidos histológicamente remanentes de tumor microscópicos después de la resección.		
G2	Moderadamente diferenciado		R2: Resección incompleta, remanentes involucrados en los márgenes después de la resección		
G3	Mal diferenciado				
G4	Indiferenciado				

**Tabla 3.** Comparación de la etapa AJCC/TNM con el sistema de clasificación, Dukes y Astler-Coller (Tabla tomada de [www.intramed.net](http://www.intramed.net)).

#### I.4. Carcinomas

Desde el punto de vista histológico la organización mundial de la salud clasifica los carcinomas colorrectales como:

- Adenocarcinoma:
  - Medular
  - Cribiforme-comedo
  - Micropapilar
  - Mucinoso
  - Serrado
  - Con células en anillo de sello
- Carcinoma de células escamosas (Epidermoide)
- Carcinoma Adenoescamoso
- Carcinoma de células fusiformes
- Carcinoma Indiferenciado

En cuanto a los tumores malignos, el adenocarcinoma comprende aproximadamente el 95% de todos los tumores primitivos. Los tumores carcinoides suponen alrededor del 2% y el resto (3%) lo ocupan sarcomas y linfomas, principalmente, y por último, a gran distancia, melanomas, carcinomas escamosos, etc.

**Adenocarcinoma convencional (CC)** es forma habitual de la neoplasia maligna del epitelio glandular colónico. Este tipo de adenocarcinoma es el que no presenta ninguna de las características histológicas de los subtipos de adenocarcinoma que se describen a continuación y que representan entre el 15-25% de todos los adenocarcinomas, por lo que el adenocarcinoma convencional es la forma más frecuente

de CCR. Entre las características histológicas del patrón convencional encontramos: citoplasma basófilo, alta relación núcleo-citoplasma, zonas necrosadas y glándulas sin serraciones pero con crecimiento tubular o papilar.

El **adenocarcinoma mucinoso** representa entre el 8-10% de los CCR y se caracteriza por la producción de mucina extracelular en una proporción superior al 50% de la superficie de la tumoración. Los adenocarcinomas que muestran mucina en menor proporción (<50% del tumor) se clasifican como adenocarcinomas con componente mucinoso. Algunos de los adenocarcinomas mucinosos y con componente mucinoso son adenocarcinomas con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) (**Hamilton et al, 2010**). Los adenocarcinomas mucinosos que son estables para microsatélites (MSS) o tienen niveles bajos de inestabilidad (MSI-L) suelen ser tumores de alto grado.

Los **carcinomas de células en “anillo de sello”** constituyen menos del 1% de CCR y se caracteriza porque más del 50% de las células neoplásicas muestran abundante mucina intracelular (**Fleming et al, 2012**). Algunos carcinomas con células en “anillo de sello” con MSI-H suelen ser de bajo grado; sin embargo los casos que no son MSI-H suelen ser muy agresivos y representan una variante de adenocarcinoma mucinoso de mal pronóstico que es más frecuente en pacientes jóvenes (**Hamilton et al, 2010**).

El **adenocarcinoma medular** es una rara variante de CCR que suele observarse en el colon proximal y es más común en mujeres. Se caracteriza porque las células tumorales se disponen en sábana y nidos sólidos con citoplasma abundante y nucleolo prominente, siendo de destacar la presencia de frecuentes linfocitos intratumorales. Esta

variante está relacionada con los CCR con inestabilidad de microsatélites (MSI) y suelen tener buen pronóstico (**Hamilton et al, 2010**).

El **adenocarcinoma de tipo cribiforme-comedo** muestra extensas áreas de patrón cribiforme con necrosis tumoral central semejante a la observada en los carcinomas ductales de mama. Suelen ser MSS y presentar el fenotipo de metilación de islas CpG (CIMP) de alto grado (CIMP-H) (**Hamilton et al, 2010**).

El **adenocarcinoma micropapilar** es una variante rara de CCR en la que se observan pequeños nidos de células tumorales dentro de espacios estromales que simulan luces vasculares. Este patrón también se ha descrito en cánceres de mama y de vejiga. También puede aparecer como patrón secundario en un CC (**Hamilton et al, 2010**).

El **carcinoma adenoescamoso** es un carcinoma que presenta características de carcinoma escamoso y adenocarcinoma en áreas separadas o mezcladas. El carcinoma escamoso puro es raro en el colon (**Hamilton et al, 2010**).

El **carcinoma indiferenciado** es un carcinoma que no muestra diferenciación ni histológica, ni inmunohistoquímica ni molecular. Muchos de estos tumores son carcinomas con MSI (**Hamilton et al, 2010**).

El adenocarcinoma serrado (CS) representa entre el 7,5-20% de los CCR (**Mäkinen et al, 2001; O'Brien et al. 2008**). Los criterios histológicos para su diagnóstico incluyen glándulas con luz serrada revestidas por células con abundante

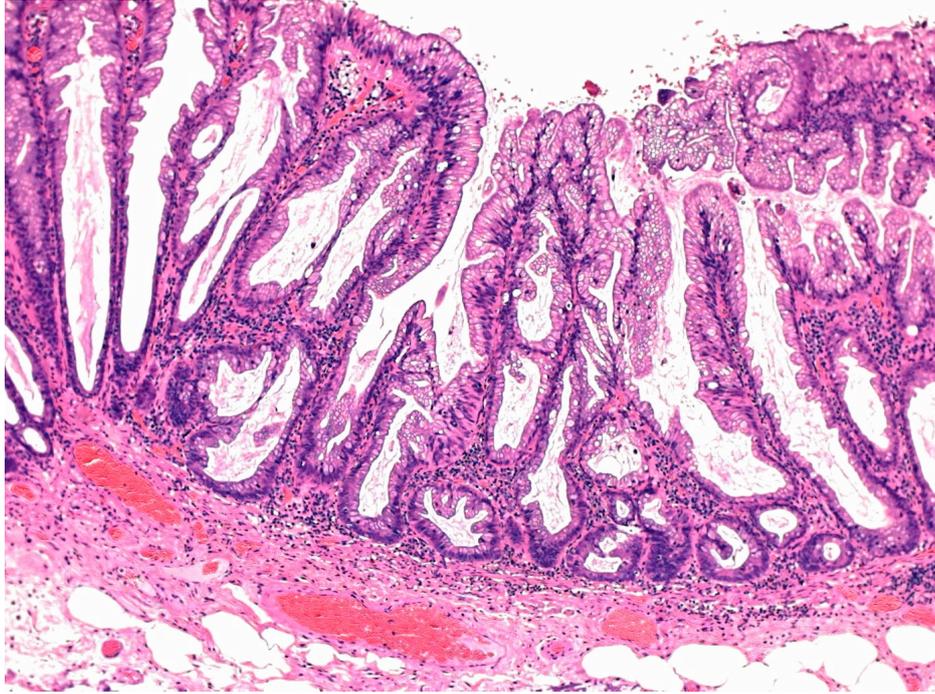
citoplasma claro o eosinófilo, núcleo vesicular de disposición basal y ausencia o menos de un 10% de necrosis de la superficie total del tumor; en los CS mucinosos producción de mucina, presencia de bastones papilares y bolas celulares flotando en zonas mucinosas del tumor (**Mäkinen MJ, 2007**). El CS tiene peor pronóstico que los carcinomas convencionales (**García-Solano et al, 2010**) y su mayor agresividad puede ser debida a la presencia de un fenotipo histológico particular mostrado en el frente invasivo tumoral como es el alto grado de gemación y pseudofragmentos, una respuesta linfocítica más débil y con un patrón de crecimiento tumoral infiltrativo, siendo estos útiles marcadores predictivos de peor evolución para el CCR (**García-Solano et al, 2011**). Presentan un patrón de expresión diferente para moléculas de adhesión como la  $\beta$ -catenina, E-cadherina y laminina 5 $\gamma$ 2 en el frente del tumor pero no en el centro tumoral sugiriendo que las rutas implicadas en la invasión tumoral en los CS son diferentes a las de los CC (**García-Solano et al, 2012a**).

El CCR con criterios histológicos de MSI-H tiene como características histológicas la presencia de patrón heterogéneo en la misma neoplasia observándose zonas tubulares, mucinosa (con o sin células en anillo de sello) y de tipo medular asociado a una intensa respuesta linfoide por parte del huésped, que consiste en linfocitos que infiltran el tumor, reacción linfocítica peritumoral en nódulos linfoides en submucosa o subserosa (infiltrado linfoide de tipo Crohn-like o ILC) (**Umar A et al, 2004**). El CCR se caracteriza por una amplia y compleja alteración de los niveles séricos de citoquinas y quimioquinas (**Kantola T et al, 2012**). La densidad del infiltrado inflamatorio descende en las etapas más avanzadas del CCR (**Väyrynen JP et al, 2013**). La reacción ILC contribuye a la inmunidad adaptativa antitumoral siendo

útil la evaluación cuantitativa de su densidad como indicador pronóstico relevante en el CCR (Väyrynen JP et al, 2014).

La presencia de factores pronosticos histológicos adversos como el alto grado de gemación tumoral y la débil infiltración linfocítica peritumoral en el frente invasivo es más frecuente en los CS con MSI-H que en los CCR hMSI-H (García-Solano et al 2012b).

Los CCR MSI-H se originan a partir de un tipo de adenoma serrado. El pólipo serrado que se asocia como el precursor del CCR MSI-H es el adenoma serrado sésil (ASS). Este adenoma serrado es similar en arquitectura al pólipo hiperplásico (PH) pero muestra unas alteraciones arquitecturales que lo diferencian como son glándulas serradas en la zona profunda con dilatación glándular y mucina que no se observa en la zona profunda proliferativa del pólipo hiperplásico (Figura 7) y se localizan con más frecuencia en el colon derecho. La presencia de necrosis sucia se asocia de forma negativa a este tipo tumoral (Jass JR, 2007). El CCR MSI-H se observa con mayor frecuencia en pacientes de edad avanzada, localización en el colon derecho y en un estadios clínicos menos avanzados (Alexander J et al, 2001). Los CRC MSI-H esporádicos no suelen presentar gemación tumoral pero si la presentan no expresan  $\beta$ -catenina nuclear o laminina 5 $\gamma$ 2 ni pseudofragmentos citoplasmáticos mientras que los CS proximales a pesar de no presentar  $\beta$ -catenina en la gemación tumoral la existencia de gemación tumoral de alto grado (71.4%), expresion de laminina 5 $\gamma$ 2 citoplasmática (57.1%) y alto grado de pseudofragmentos citoplasmáticos (42.8%) está incrementada (García-Solano et al, 2012a).



**Figura 7.** Adenoma serrado sésil. H&E 20X

### 1.5. Adenomas

Los adenomas son pólipos compuestos por epitelio displásico. Hay dos tipos de adenomas: los convencionales y los serrados. Ambos tipos son premalignos, pero difieren en el aspecto histológico, características clínicas y origen molecular.

**Los adenomas convencionales** son los adenomas más frecuentes y nacen por la proliferación de células epiteliales displásicas de la mucosa que portan mutaciones en la vía del gen *APC* y el de la  *$\beta$ -catenina*, *CTNNB1*. La mayoría son asintomáticos y descubiertos incidentalmente. Endoscópicamente se clasifican en sésiles o pediculados y aparecen localizados con más frecuencia en la porción recto-sigma (Arévalo F et al, 2012). Histológicamente los adenomas convencionales se subclasifican en Adenoma Tubular (AT), Velloso (AV) y Tubulovelloso (ATV) basándose en la proporción de

glándulas y componente veloso del adenoma: los AT muestran <25% de componente veloso y predomina la proliferación glandular, los AV muestran un componente veloso >75% del adenoma y escaso componente glandular y el ATV muestra un componente veloso entre 25 y 75% (**Hamilton SR et al, 2010**).

El riesgo de malignización de los adenomas depende del tamaño, grado de displasia y tipo de arquitectura. Los adenomas con displasia de alto grado tienen un riesgo de malignización de 27%, mayor a los de bajo grado que es de solo 5% en 15 años. Asimismo la arquitectura vellosa presenta mayor riesgo que la tubular (**Fenoglio-Preiser CM, 2008**).

**El adenoma serrado**, descrito originalmente por Longacre y Fenoglio-Preise, fue considerado inicialmente una lesión de menor importancia representando solo el 0.6 % de más de 18.000 pólipos estudiados frente al 2-3.5% estimado en artículos posteriores, debido probablemente a la falta de reconocimiento (**Jass JR, 2003**). La cuarta edición de la clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) (**Snover D et al, 2010**) subcategoriza los pólipos serrados en tres grupos: pólipo hiperplásico, adenoma serrado sésil, y adenoma serrado tradicional. Sus características histológicas se describen más adelante cuando se comenta la vía serrada de carcinogénesis colorrectal.

Los adenomas serrados presentan displasia significativa en más de un tercio de los casos y carcinoma intramucoso en el 11 % de los casos (**Mäkinen MJ, 2007**). Probablemente crecen con más rapidez que los adenomas tubulares y tienden a

reaparecer con más frecuencia que los adenomas convencionales. Los adenomas serrados tienen un riesgo importante de malignidad (**Lazarus R et al, 2005**).

### **1.6. Alteraciones genéticas del carcinoma colorrectal**

El concepto actual de carcinogénesis colorrectal implica una cascada de fallos genéticos que afectan a oncogenes, genes supresores de tumores y a genes reparadores del ADN.

Diferentes mutaciones génicas se han relacionado con la carcinogénesis colorrectal, pero el papel exacto de muchos de estos genes en la iniciación y progresión de la enfermedad todavía no ha sido confirmada. Solo un número limitado de estos genes (*APC*, *TP53* y *KRAS*) se ha encontrado alterado en una notable proporción de CCR, pero la combinación de estas mutaciones en el mismo cáncer es infrecuente (**Al-Sohaily S et al, 2012**).

Fearon y Vogelstein propusieron un modelo de carcinogénesis colorrectal que correlaciona eventos genéticos específicos con la evolución de la morfología tisular. Las alteraciones se originan por diversas mutaciones adquiridas en células somáticas, que ocasionan la inactivación de genes supresores de tumores como *APC*, *DCC* (del inglés Deleted in Colorectal Carcinoma) y *TP53* y la amplificación de oncogenes como *KRAS* y *CTNNB1* (**Palacio y Muñetón, 2012**).

## **I.6.1. Activación de Oncogenes**

### **I.6.1.1. Oncogén *KRAS***

El proto-oncogen *KRAS* se localiza en la región 12p12.1 y codifica para una isoenzima de la familia de GTP-asas RAS a la cual también pertenecen H-RAS y N-RAS. K-RAS es, como miembro de la familia RAS, una proteína G que actúa como interruptor molecular, estando activa cuando está unida al nucleótido trifosfato GTP, permitiendo así la transducción de señales del exterior hacia el interior de la célula (**Chang DZ et al, 2009**). *KRAS* activa un gran número de vías de señales de transducción, entre ellas la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la ruta de la supervivencia PI3K/AKT (**Castellano E and Downward J, 2011**). *KRAS* se encuentra frecuentemente mutado durante las etapas tempranas de los estadios de desarrollo del CCR, ya que en torno a un 35%-42% de CCRs y de adenomas avanzados presentan mutaciones en este gen. Recientemente se ha visto que la mutación en *KRAS* promueve un crecimiento hiperplásico en el epitelio colorrectal y suprime la diferenciación en la mutación *APC* en CCR (**Moran et al, 2010**). Para contribuir a la carcinogénesis colorrectal, las mutaciones en *KRAS* han de ser mutaciones “sin sentido” en uno de los codones 12, 13 o 61 que tienen como consecuencia la incapacidad de *KRAS* de ejercer su actividad GTPasa quedando unida permanentemente a GTP, con lo que aparece ganancia de función de la proteína y activación constitutiva de rutas moleculares de proliferación. Además, la mutación de *KRAS* ha de seguir a la pérdida de *APC* ya que si *APC* está intacto, solo se origina una lesión microscópica en el fondo glandular denominada foco aberrante no neoplásico. Las mutaciones de *KRAS* se asocian con, al menos, dos características histopatológicas: mayor tamaño y mayor intensidad de displasia. Además, estas mutaciones se asocia con mayor agresividad pues el pequeño grupo de adenomas de un tamaño inferior al centímetro que presentan mutación del

*KRAS* experimentan una rápida evolución a displasia severa y carcinoma (**Catalán V et al, 2003**).

Las mutaciones activadoras del gen *KRAS* está presentes entre el 37% y el 50% de los CCR (**Markowitz SD and Bertagnolli MM, 2009, Hamilton et al, 2010**) y son prevalentes en la vía supresora de Vogelstein (secuencia adenoma-carcinoma) y también se observa en algunos pólipos serrados (**Huang et al, 2011**).

#### **I.6.1.2. Oncogén *BRAF***

El protooncogén *BRAF* (7q34) (B-type rapidly accelerated fibrosarcoma) está compuesto por 18 exones y codifica para una proteína con actividad serina-treonina quinasa, que actúa en la vía de señalización RAS-RAF-MAPK (Figura 8) (**Sharma SG and Gulley ML, 2010**).

Entre el 5% y el 15% de los CCRs presentan mutaciones en el gen *BRAF*, la mayoría en el exón 15, debido a un cambio de ácido glutámico por valina en el codón 600 de la proteína (V600E) (**Rozek LS et al, 2010**). Más concretamente esta mutación ocurre aproximadamente en 91% de los CCR esporádicos con MSI-H, pero no se observan en los pacientes con el síndrome de Lynch (**Sharma SG and Gulley ML, 2010**). Las mutaciones en *BRAF* tienen lugar en asociación con el fenotipo CIMP en los pólipos serrados colorrectales y en los CCR con MSI-H (**Velho S et al, 2008**).

Esta mutación tiene alta sensibilidad y especificidad por la vía del pólipo serrado y es raramente observada en la vía convencional de la secuencia adenoma-carcinoma descrita por Vogelstein y Fearon (**O'Brien et al, 2006; Huang et al, 2011**).

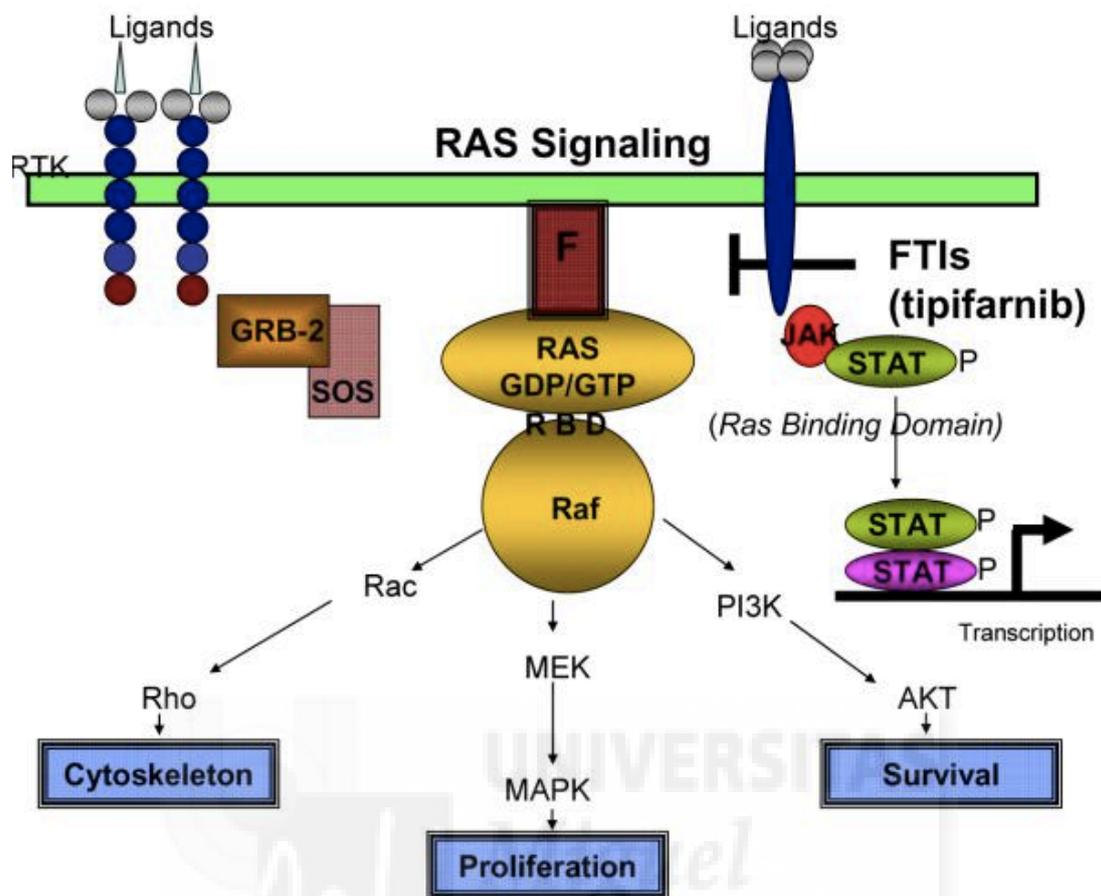


Figura 8. Vía de señalización de RAS.

### I.6.1.3. Oncogén *PI3K*

El fosfatidilinositol 3 quinasa (*PI3K*) pertenece a la familia de quinasas lipídicas heterodiméricas. Es activada por varios receptores tirosín quinasa, receptores de factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), *EGFR2*, factor crecimiento de insulina, y factor de crecimiento derivado de plaquetas. *PI3K* estimula y regula distintos procesos celulares, incluyendo proliferación, supervivencia, apoptosis, migración y metabolismo (Figura 9) (Campbell IG et al, 204; Samuels Y et al, 2004). En la vía *PI3K/AKT/mTOR*, el gen supresor tumoral *PTEN* (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) es un antagonista directo y la pérdida o mutación de la expresión de *PTEN* ha mostrado estar

relacionado con una peor evolución en el CCR (**Sawai H et al, 2008; Jang KS et al, 2010**).

*PIK3CA* (fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa) la subunidad catalítica p110-alfa de PI3K, se encuentra comúnmente mutada en cánceres, incluyendo glioblastoma, gástrico, pulmón, ovario, pecho, y CCR. Más del 80% de mutaciones detectadas en *PIK3CA* se encuentran en dos puntos calientes, exón 9 (codón 542 y 545) y exón 20 (codón 1047) (**Samuels Y et al, 2004**). Las mutaciones en el gen *PIK3CA* conducen a la regulación positiva de la señal PI3K, y están presentes en aproximadamente el 15-20% de los CCRs.

Los análisis detallados han mostrado una disminución gradual de la mutación en *PIK3CA* desde el colon proximal (ciego/colon ascendente) al colon distal (sigmoide/recto) de un 21-25% a 8-9% respectivamente (**Day FL et al, 2013; Rosty C et al, 2013**). Además, el CCR con *PIK3CA* mutado se ha asociado con un fenotipo histológico mucinoso. A diferencia de otros marcadores moleculares, como *BRAF* y *KRAS*, los cuales son mutuamente excluyentes, las mutaciones en *PIK3CA* han mostrado en la mayoría de los estudios estar asociadas a la mutación en *KRAS* y la pérdida de expresión de MGMT (o6-metilguanina-ADN metiltransferasa) (**Nosho K et al, 2008; Day FL et al, 2013**).

La actividad de la ruta PI3K/AKT potencia la síntesis de prostaglandina E2 que inhibe la apoptosis de las células de CCR. La aspirina puede bloquear la vía PI3K y ha mostrado un incremento significativo en la supervivencia de los pacientes con CCR y

mutación *PIK3CA*, en contraste con los portadores nativos de *PIK3CA* que no se benefician (Liao X et al, 2012).

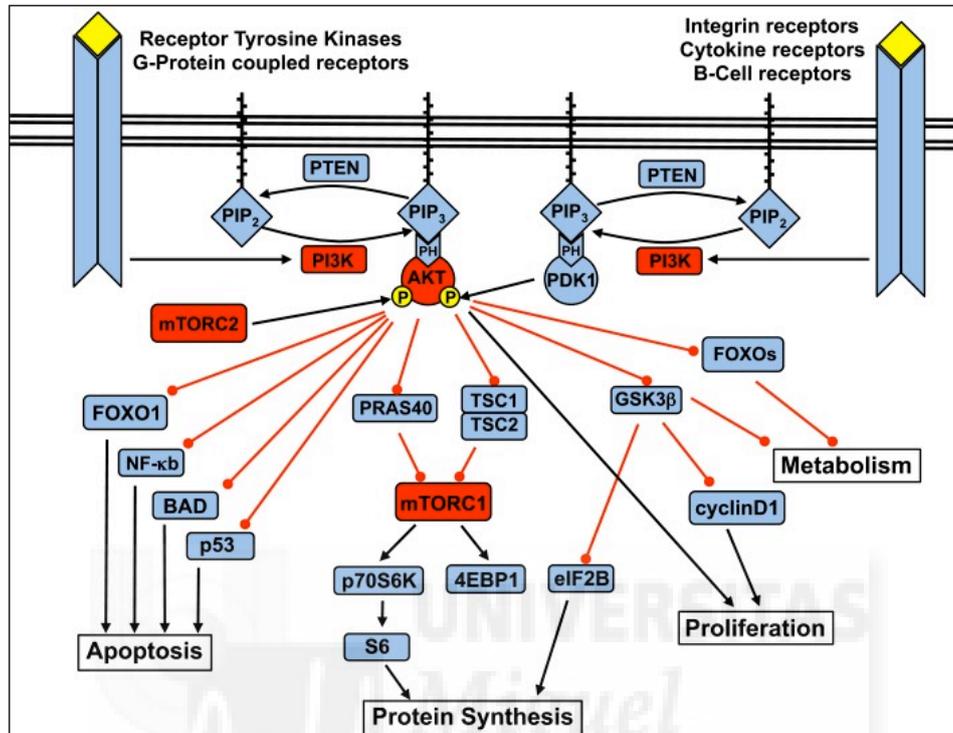


Figura 9. Vía de señalización del gen *PI3K* (Loh AH et al, 2013)

## I.6.2. Inactivación mutacional de genes supresores de tumores

Las mutaciones somáticas resultado de la pérdida de función del gen *APC* son los defectos genéticos mas comúnmente observados en genes supresores tumorales en CCR esporádico. Otros ejemplos importantes incluyen la pérdida de la función de *TP53* y de TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta).

### I.6.2.1. El gen *APC*

El gen *APC* (5q21) contiene 15 exones y se encuentra mutado en el 60% y el 82% de cánceres de colon y recto respectivamente (Jass JR, 2002). Participa en la vía

WNT (Wingless-type), donde forma parte de un complejo multiproteico que se une a  $\beta$ -catenina y causa su fosforilación, ubiquitinación posterior y destrucción por el proteosoma. Este complejo está principalmente constituido por APC, axina, y GSK3B (Glycogen synthase kinase 3 beta). Si este complejo es interrumpido, por múltiples causas, la  $\beta$ -catenina no va directamente a degradarse y puede translocarse al núcleo y cotransactivar diferentes genes que regulan el ciclo celular (ciclina D, c-Myc (cellular homolog of the retroviral v-myc oncogene)) y que participan en la promoción tumoral (MMP-7, MMP-26) (matrix metalloproteinase) (**Barker N, 2008**). Una de las principales causas de interrupción de este complejo multiproteico es la mutación en *APC*. Estas mutaciones interfieren en la unión a la  $\beta$ -catenina y como consecuencia se produce la activación constitutiva de la vía WNT (**Ng TL et al, 2005**).

La mayoría de las mutaciones puntuales en *APC* generan un codón de parada en el ARNm, cuyo resultado es la pérdida de las funciones en el extremo carboxilo terminal de la proteína, en donde se encuentran los sitios de unión a la  $\beta$ -catenina y la axina (**Smith G et al, 2002**). Otras mutaciones comunes son inserciones o deleciones que generan una alteración en el marco de lectura del ARNm (**de la Chapelle A, 2004**). La activación de la vía WNT contribuye a la pérdida de E-cadherina en el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM). La TEM se define como un proceso por el cual células epiteliales pierden sus características (adhesión celular mediada por E-cadherina) y adquieren propiedades mesenquimales (aumento en movilidad e invasividad, resistencia a apoptosis, y cambios morfológicos). Este proceso es reversible y participa en el desarrollo normal embrionario. La TEM es un proceso dominante en la metástasis del CCR. De hecho, las células del CCR con características de TEM se ha demostrado que poseen características de células “stem”. Los estudios de microarrays

han demostrado la sobreexpresión de genes mediadores de la TEM en pacientes con CCR, por ejemplo, *VIM*, *TWIST 1*, *TWIST 2*, *SNAIL*, y *FOXC 1*, *FOXC 2* (**Ong BA et al, 2014**).

El efecto de la actividad combinada de TEM y transición mesénquima epitelio (TME) favorece el avance metastásico del CCR: TEM permite al tumor primario escapar y propagarse por vía de intermediarios mesenquimales, y TME devuelve al CCR al fenotipo altamente proliferativo epitelial de célula stem (**Hur K et al, 2013**).

Sin embargo APC también tiene funciones independientes de la vía WNT y su alteración puede estar relacionada con los fenómenos de inestabilidad cromosómica (CIN) asociada a la secuencia adenoma-carcinoma, ya que APC participa en la correcta segregación de las cromátidas durante la mitosis (**Rusan NM and Peifer M, 2008; Worthley DL et al, 2007**). Por tanto, las mutaciones en *APC* son frecuentemente un suceso temprano en la carcinogénesis del CCR y *APC* se relaciona en la carcinogénesis a distintos niveles: su actividad en la vía WNT, su relación con el citoesqueleto (**Näthke IS et al 1996**), su papel en la segregación de los cromosomas (**Green RA et al, 2005; Rusan NM and Peifer M, 2008**) y en su participación en la adhesión (**Senda T et al, 2007**).

#### **I.6.2.2. El gen *TP53***

P53 es codificado por el gen *TP53* localizado en 17p13.1. Su expresión es anormal en más del 50% de tumores humanos. La mutación o pérdida de p53 normalmente ocurre en la transición de adenoma a cáncer en la secuencia descrita Vogelstein y Fearon. La mayoría de las mutaciones puntuales ocurren en los exones 5 a

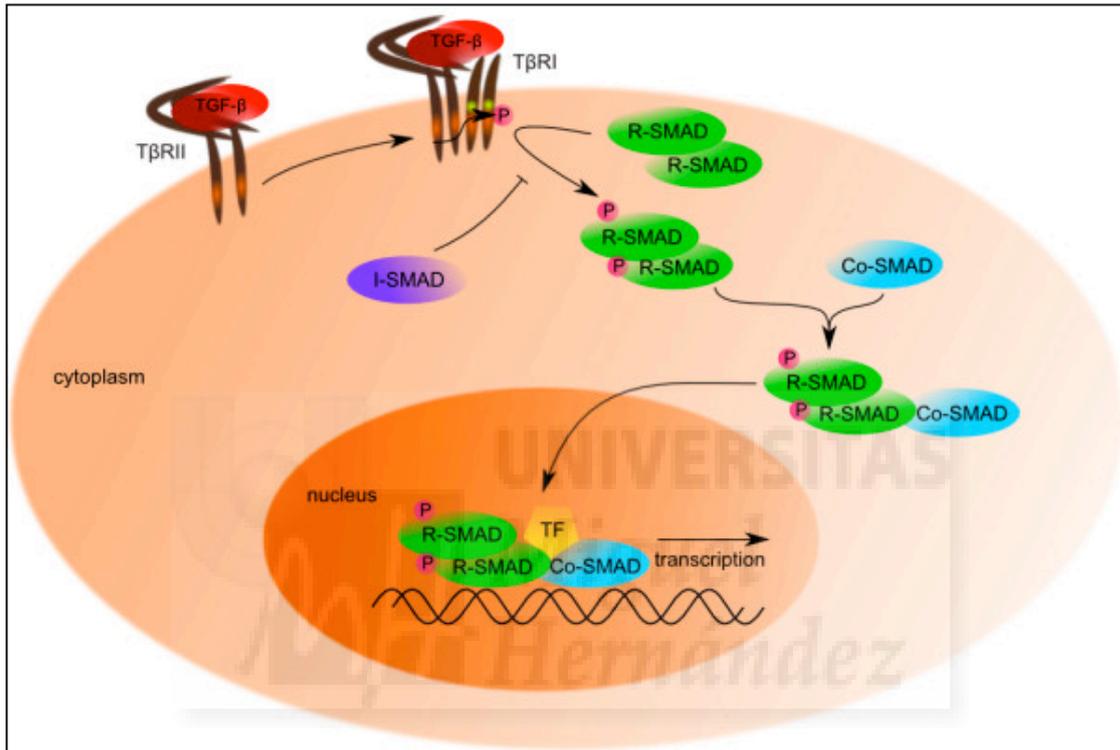
8 que codifican los codones 130 al 286, en donde se encuentra el dominio de unión al ADN. Las mutaciones en este gen ocurren principalmente por cambio de sentido (73,4%); también inserciones, deleciones que alteran el marco de lectura (9,02%), mutaciones sin sentido (7,67%) y silenciosas (4,26%) que se asocian con estados avanzados del cáncer (Olivier M et al, 2010). Específicamente en el CCR, ocurren mutaciones puntuales en los codones 175, 245, 248, 273 y 282 aproximadamente en 43% de los casos (Murray H et al, 2009).

### **I.6.2.3. La vía supresora tumoral TGF- $\beta$**

La desregulación de esta vía se observa con frecuencia en el CCR mediada por mutaciones inactivantes de los receptores celulares (TGF- $\beta$ R1, TGF- $\beta$ R2) o genes de vías de señalización postreceptor (*SMAD2*, *SMAD4* (*Drosophila* 'mothers against decapentaplegic' gen). La mutación de genes receptores de TGF- $\beta$  ocurre comúnmente en asociación con transformación maligna y se ha visto asociados con tumores con MSI (Ewing et al, 2014).

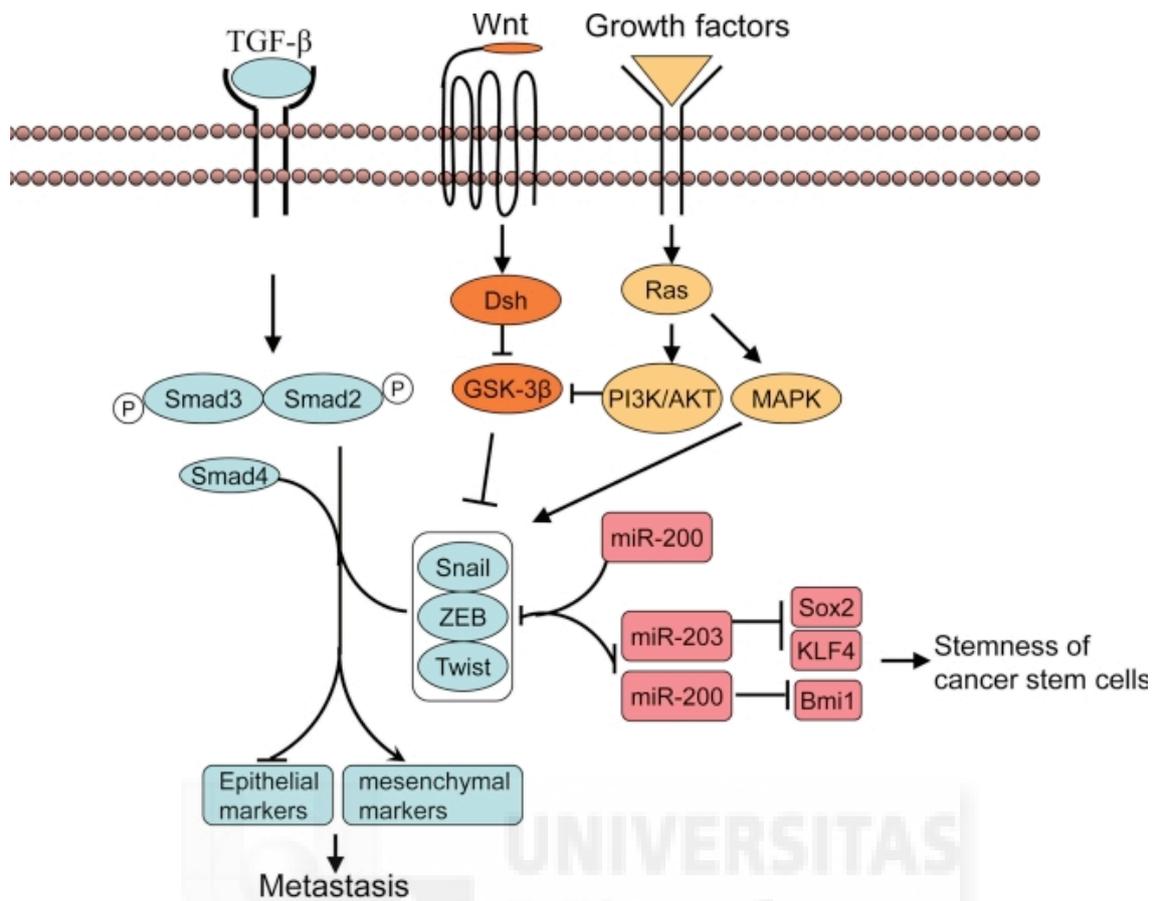
La señalización se inicia cuando diferentes variantes de la familia de TGF- $\beta$ , como TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3 o BMP, se unen al complejo de receptores tipos I y II de TGF- $\beta$  con actividad serina/treonina-quinasas, y permiten la propagación de la señal mediante la fosforilación del receptor de Smad (Figura 10) (Mao G et al, 2008). Estos receptores interaccionan con el factor de transcripción Smad 4 y al heterodimerizarse promueven su transporte al núcleo, donde reconocen y se asocian a secuencias Smad de unión al ADN, potenciando o reprimiendo la transcripción de determinados genes mediante el reclutamiento de coactivadores, correpresores y factores de remodelación de la cromatina (Massagué J et al, 2005).

Las alteraciones en el gen *SMAD4* están presentes entre el 16% y 25% de los casos de CCR, mientras que un 6% ocurre en *SMAD2*. Cuando estas alteraciones ocurren en la línea germinal los individuos desarrollan poliposis juvenil y poliposis hamartomatosas (**Ramírez N et al, 2008**).



**Figura 10.** Esquema de la vía de señalización del TGF- $\beta$  (**Kubiczkova L et al, 2012**).

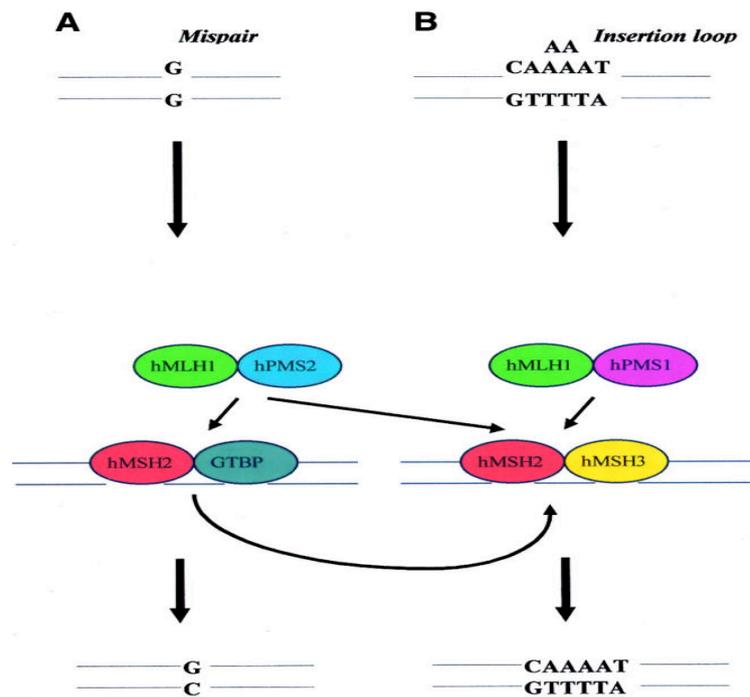
El TGF- $\beta$  frecuentemente se encuentra sobreexpresado en cáncer colorrectal metastásico y los niveles circulantes de esta citoquina pueden ser un indicador de metástasis hepática. TGF- $\beta$  es el mayor inductor de la TEM, entre células de colon y hepáticas. TGF- $\beta$  media la TEM permitiendo a las células epiteliales que adquieran una morfología fibroblástica, perdiendo su polaridad y la expresión de E-cadherina así como de otras moléculas de adhesión, con un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales (Figura 11) (**Hirakawa M et al, 2014**).



**Figura 11.** Esquema de la vía de transducción de señal asociada con la TEM. Imagen tomada de (Xiao D. and He J, 2010).

### I.6.3. Defectos en la reparación del ADN

El sistema de reparación del ADN tipo MMR reconoce y repara desapareamientos en pares de bases que se producen durante la replicación (Figura 12).



**Figura 12.** Sistema de reparación MMR. Una base mal apareada es reconocida por el complejo hMSH2/GTBP mientras un bucle inserción/delección es reconocido por el complejo hMSH2/hMSH3 . Las proteínas MutL (complejos hMLH1/hPMS2 y hMLH1/hPMS1) interactúan con las proteínas MutS que ya están enlazadas a las bases relacionadas con MMR (Wheeler J et al, 2000).

Las mutaciones germinales en genes MMR constituyen la base molecular para que el 80% de los portadores desarrollen del CCHNP o síndrome de Lynch (Ewing et al, 2014), mientras que las mutaciones somáticas o el silenciamiento por hipermetilación de genes MMR explican alrededor del 15 % de CCR esporádicos. Entre los miembros del sistema de identificación de MMR se encuentran: *MSH2*, *MSH1*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH3*, *PMS1* y *Exo1*. El CCR esporádico MSI-H normalmente es

causado por silenciamiento por hipermetilación de *MLH1* (**Boland CR and Goel A, 2010**).

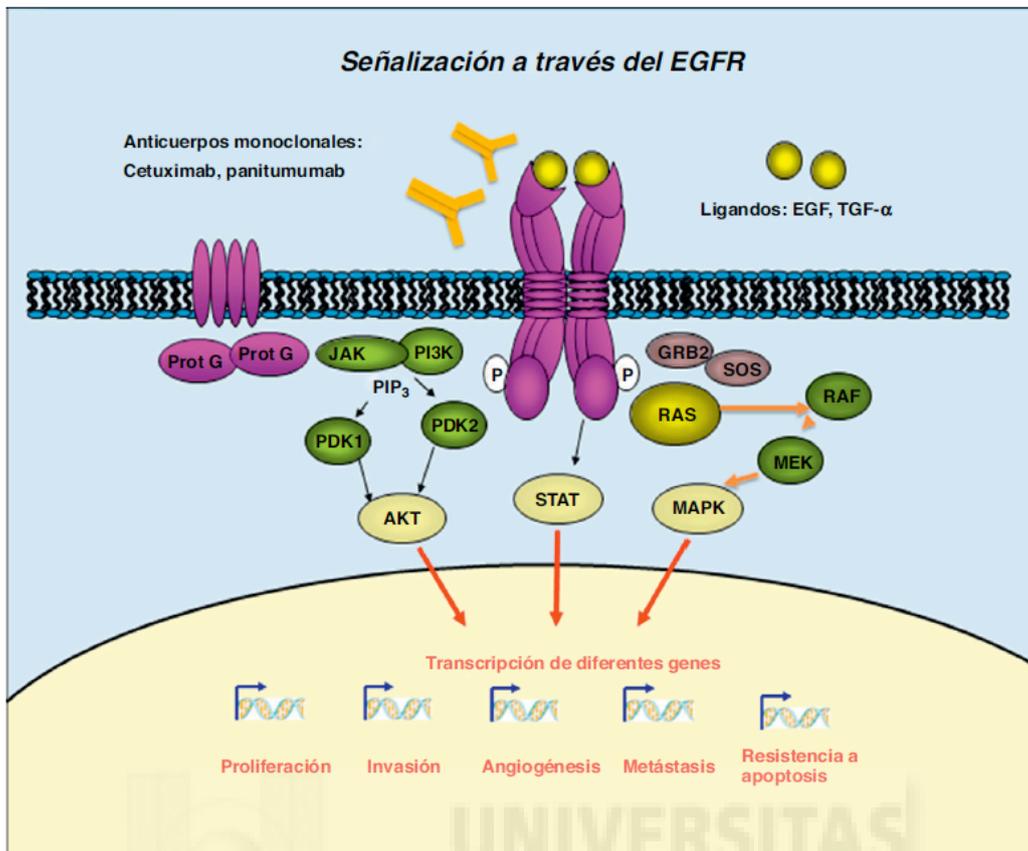
En el caso del CCR MSI-H esporádico (CCR MSI-H) la base molecular parece estar en la hipermetilación anómala de las islas CpG de los promotores de los genes que codifican para las proteínas MMR, fundamentalmente en el gen *MLH1* lo que conduce a su silenciamiento y pérdida de expresión de la proteína (**Veigl et al, 1998**). En los casos hereditarios, los genes más importantes del sistema MMR relacionados con el CCR son el *MLH1* y el *MSH2*, en los cuales ocurre más del 90% de las mutaciones (**Boland CR and Goel A, 2010**).

#### **Reparación del ADN por escisión de bases:**

El sistema de reparación por escisión se divide en dos subcategorías, reparación por escisión de base y escisión por reparación de nucleótidos. *MYH* es un gen de reparación por escisión de base, responsable de reparar el ADN dañado por especies reactivas de oxígeno. La poliposis se desarrolla por la presencia de la mutación germinal de ambos alelos de *MYH* (**Ewing et al, 2014**).

#### **I.7. Valor predictivo de las mutaciones *KRAS/BRAF* en terapia anti-EGFR**

Los receptores de factor de crecimiento epidérmico son una amplia familia de receptores con actividad tirosin quinasa. El EGFR ha mostrado un importante papel en el desarrollo del crecimiento de las células tumorales, donde está involucrado en un número de respuestas celulares que incluyen proliferación y apoptosis (Figura 13) (**Seshacharyulu P et al, 2012**).



**Figura 13.** Esquema de señalización mediada por el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Tomado de (Hernandez-Losa J et al, 2012)

Los anticuerpos monoclonales contra EGFR y frente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) son, junto con quimioterápicos clásicos como el irinotecan, los protocolos más efectivos para pacientes con enfermedad metastásica (Cripps C et al, 2010; Falchook GS et al, 2014).

Subyacente al EGFR y tras su activación, la señal puede dirigirse por tres vías de señalización hacia el interior de la célula: a través de la activación de RAS-BRAF-MAPK, tras la activación de PI3K-AKT-PTEN-mTOR y mediante la vía de STAT3.

De los tres miembros de genes de la familia *RAS*, el gen *KRAS* es el que presenta mayor frecuencia de mutación en los carcinomas de colon. Cuando hay mutaciones de *KRAS* la proteína RAS permanece constitutivamente activada. *BRAF* codifica para una serín-treonina quinasa que es sustrato de la actividad *KRAS*. Las mutaciones de *BRAF* son generalmente excluyentes con las mutaciones de *KRAS* y se detectan en aproximadamente el 8-10% de los carcinomas colorrectales. Algunos trabajos han asociado mutaciones en *BRAF* con una falta de respuesta a tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Las mutaciones en *BRAF* tienden a asociarse con un periodo libre de enfermedad más corto y una disminución de la supervivencia global, independientemente de estatus del *KRAS* y de los tratamientos. Así, las mutaciones de *KRAS* que se asocian a una activación constitutiva, confieren resistencia al tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR. La FDA (Food and Drug Administration) y la EMEA (Agencia Europea del Medicamento) aprobaron el estudio rutinario del estado mutacional de *KRAS* en el CCR previo a la aplicación clínica de anticuerpos monoclonales contra el EGFR (**Hernandez-Losa J et al, 2012**). Las mutaciones en *KRAS* solo acontecen en el 30-40% de los pacientes no respondedores.

Más recientemente algunos autores han sugerido que pacientes cuyos tumores llevan el alelo *BRAF* V600E no son propensos a experimentar un beneficio clínico significativo de tratamiento con cetuximab o panitumumab (**Di Nicolantonio F et al, 2008**). *BRAF* es el principal efector de *KRAS* y su mutación oncogénica es mutuamente excluyente de las mutaciones *KRAS* en los CCRs (**Rajagopalan H et al, 2002**).

Los pacientes que presentan mutaciones en *BRAF* no responden a la terapia con anticuerpos monoclonales, incluso si tienen *KRAS* silvestre, lo que demuestra que la

ausencia de mutaciones en *BRAF* es necesaria para responder a la terapia con anticuerpos monoclonales en el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico. Por lo tanto, si sumamos los tumores *BRAF* mutado (aproximadamente 10%) y los que presentan mutaciones de *KRAS* (35-45%) podemos asumir que hasta un 55% no responderán al tratamiento. Así, las guías actuales están considerando que en los pacientes con CCR metastásico en los que se considere la terapia con anti-EGFR se debería analizar la presencia de mutaciones en *KRAS* y *BRAF* (**Di Nicolantonio F et al, 2008**).

Además de usar anticuerpos monoclonales anti-EGFR, deben considerarse terapias alternativas. La evaluación, no sólo de *KRAS* y *BRAF*, sino también alteraciones PIK3CA/PTEN podrían ser útiles para la selección de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico que tienen pocas probabilidades de responder a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR (**Perrone F et al, 2009**).

Las células CCR con mutación en *BRAF* pueden potencialmente responder a la terapia con anticuerpos monoclonales anti EGFR si se administra concomitantemente un inhibidor de *BRAF* como sorafenib con cetuximab o panitumumab (**Di Nicolantonio F, 2008**).

### **I.8. Rutas moleculares de carcinogénesis colorrectal**

La pérdida de estabilidad genómica facilita la adquisición de múltiples mutaciones que conducen al desarrollo del CCR. El CCR es una enfermedad heterogénea con diferentes rutas moleculares que producen distintos fenotipos. La inestabilidad genómica puede ser consecuencia de diversas alteraciones génicas:

inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites, metilación aberrante del ADN (**Markowitz SD and Bertagnolli MM, 2009; Pritchard CC and Grady WM, 2011**) y vía del pólipo serrado.

### **I.8.1. Vía de inestabilidad cromosómica o vía supresora**

Aproximadamente un 75% de los CCRs se producen por esta vía (**Grady and Carethers, 2008**) y tendrían como tipo histológico mayoritario el carcinoma convencional. Sigue la ruta adenoma-carcinoma descrita por Vogelstein y Fearon y se caracteriza por la presencia de aberraciones estructurales o cambios en el número de copias de los cromosomas (**Pritchard CC and Grady WM, 2011**). CIN es consecuencia de defectos en la segregación de cromosomas con la consiguiente aneuploidía, disfunción de los telómeros o defectos en los mecanismos de respuesta al daño del ADN. Como consecuencia se produce un desequilibrio en el número de cromosomas, amplificaciones genómicas de regiones cromosómicas, y alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad (LOH) (**Pino MS and Chung DC, 2010**). Las alteraciones en genes supresores tumorales como *APC*, *P53*, y *DCC* y en oncogenes como *KRAS* son característicos de esta vía. Los tumores CIN se caracterizan por alta frecuencia de desequilibrios alélicos (más frecuentemente afectando a los brazos de los cromosomas 5q, 8p, 17p y 18q), amplificaciones cromosómicas y translocaciones (**Pawlik TM et al, 2004**). La alteración genética individual más común son las mutaciones en los genes *APC* y *KRAS* (**Al-Sohaily S et al, 2012**).

### **I.8.2. Vía de inestabilidad de microsatélites**

Los microsatélites son secuencias cortas repetidas de nucleótidos repartidas a lo largo del genoma entero y son propensas a producir errores durante la replicación.

Los CCR MSI generalmente se desarrollan en el colon derecho, son mucinosos, pobremente diferenciados y tienen un patrón histológico del tipo medular, infiltrado linfoide peritumoral del tipo enfermedad de Crohn, frecuentes linfocitos intratumorales, ausencia de necrosis tumoral luminal y pronóstico mejor que el observado en los CCR estables (**Jenkins MA et al, 2007**).

Los análisis de MSI se realizan con un panel de marcadores STR (por la sigla en inglés de short tandem repeat), conocidos como panel de Bethesda, entre los que se encuentran los polinucleótidos de adenina BAT25, BAT26 y BAT40, además de los dinucleótidos repetidos D5S346, D2S123, D17S250. De acuerdo con el número de repeticiones, los tumores se clasifican como MSI-H, cuando muestran dos o más marcadores inestables o como MSI-L cuando tienen inestable un solo marcador; por el contrario, en los tumores estables MSS no se encuentra inestabilidad en ninguno de los cinco STR (**Wong HL et al, 2010**). Los análisis de MSI son útiles para el cribado molecular de individuos con sospecha de CCHNP, puesto que este síndrome se relaciona con una alta frecuencia de MSI-H, mientras que los CCR esporádicos tienen un porcentaje menor cercano al 20% (**Poulogiannis G et al, 2010**).

Los tumores MSI-H se localizan predominantemente en el colon derecho y se ha reportado mayor frecuencia en mujeres (**Jeong SY et al, 2003; Ward R et al, 2001**) Típicamente presentan mayor profundidad de invasión pero de menor grado (**Gryfe R et al, 2000; Raut CP et al, 2004**).

El CCR con inestabilidad de microsatélites alta ha sido relacionado con la vía del pólipos serrado, pero esta conexión ha sido recientemente cuestionada puesto que

sólo el 20,6% de los CS muestran MSI-H y, además, presentan mutaciones en *KRAS* con mayor frecuencia que mutaciones en *BRAF* (Stefanius, 2011).

Estos tumores comparten algunas características del CS comparados con los CC, como mayor ocurrencia de mutaciones en *BRAF*, estado MSI-H, fenotipo CIMP y localización en el colon proximal. Los CCR MSI-H esporádicos suelen observarse en mujeres de edad avanzada y se originan en ASS (García-Solano J et al, 2013). Podría ser posible que algunos pólipos serrados sean los precursores de CCR MSI-H y los CSs. Las diferencias histológicas entre ambos tipos de tumores podrían atribuirse a dos rutas moleculares divergentes, una inducida por *BRAF* mutado y otra por mutaciones en *KRAS* (Worthley DL et al. 2007)

### **Características moleculares y mecanismos de carcinogénesis en tumores MSI-H.**

Los tumores MSI-H tienden a ser diploides con menos LOH. Tienen menos mutaciones en *KRAS* y *TP53*. Las mutaciones en *BRAF* V600E son frecuentes en el CCR MSI-H esporádico pero no en CCHNP. Las mutaciones en la región de poliadenina en el gen del receptor de TGF- $\beta$ II inactiva su función y se ha observado en el 90% de CCR MSI (Parsons R et al, 1995). La señalización de TGF- $\beta$ II inhibe la proliferación celular, y consecuentemente, las alteraciones en la función de genes representan un posible mecanismo en carcinogénesis MSI (Markowitz S et al, 1995).

Los tumores colorrectales con MSI característicos de la vía mutadora y serrada por mutaciones en *BRAF* son en su mayoría esporádicos, más frecuentemente en mujeres y pobremente diferenciados. En comparación con los tumores MSS, los tumores MSI son frecuentemente múltiples, bien sea de aparición sincrónica o

metacrónica, y tienen menor probabilidad de hacer metástasis a ganglios linfáticos y órganos distantes, por lo que se caracterizan por una mejor supervivencia (**Gryfe R et al, 2000**).

### **I.8.3. Modificaciones epigenéticas. Vía de metilación aberrante del ADN**

Las alteraciones epigenéticas se relacionan con cambios en la expresión génica o función sin cambio en la secuencia del ADN de un gen en particular. En los humanos, los cambios epigenéticos son normalmente causados por metilación del ADN o modificaciones de histonas. La metilación del ADN se produce comúnmente en el dinucleótido 5'-CG-3'(CpG). La metilación de la región promotora produce el silenciamiento del gen, por lo tanto proporciona un mecanismo alternativo de pérdida de función de genes supresores tumorales (**Wong JJ et al, 2007**). Entre los genes involucrados en la carcinogénesis colorrectal se encuentran silenciados por hipermetilación del ADN: *APC*, *MCC*, *MLHI*, *MGMT* entre otros (**Goldman L and Schafer AI, 2011**).

Factores ambientales como el consumo de tabaco y la edad avanzada muestran correlación con el incremento de la metilación (**Toyota M and Issa JP, 1999**; **Samowitz WS et al, 2006**).

En las células cancerosas, la hipermetilación de las islas CpG presentes en los promotores genera la inactivación en la expresión de diferentes genes, como los supresores de tumores y los de reparación. Este fenómeno de hipermetilación se conoce como fenotipo de metilación de las islas CpG o CIMP. Por el contrario, la

hipometilación de los promotores de algunos genes ocurre en estadios avanzados del cáncer y se caracteriza por el aumento en la transcripción génica (**Esteller M, 2007**).

En el CCR, basándose en un número de marcadores de metilación, el fenotipo CIMP puede dividirse en CIMP+ (positivo) y CIMP- (negativo). Los tumores CIMP+ se asocian con una menor mortalidad, sin importar tanto el estado MSI como el BRAF (**Ogino S et al, 2009**).

Dependiendo de los marcadores utilizados, el CIMP+ se detecta en 24% a 51% de todos los casos de CCR, siendo el promotor del gen *MLH1* el más frecuentemente metilado (15% de CCR con CIMP+). Se ha observado que la mitad de todos los CCR con CIMP+ presentan además MSI-H, debido a la inactivación del gen de reparación *MLH1*, concluyendo así que existe una relación clara entre la vía de inestabilidad microsatelites y la de metilación.

#### **I.8.4. Vía del pólipo serrado o vía serrada**

El adenocarcinoma serrado representa la etapa final de la vía de carcinogénesis serrada y ha sido reconocido por la OMS ((**Hamilton SR et al, 2010**) como una entidad distinta entre los cánceres colorrectales, representando el 7.5% de todos ellos (**Makinen 2007**). Son más frecuentes en mujeres mayores. Predominan en el colon derecho, donde alcanzan el 16% de los adenocarcinomas que se producen en este sitio (**Noffsinger AE, 2009**). Se origina de los pólipos con morfología serrada.

#### **I.8.4.1. Lesiones precursoras de la ruta serrada**

Como se ha comentado anteriormente, la cuarta edición de la clasificación de OMS (**Snover D et al, 2010**) subcategoriza los pólipos serrados en tres grupos: Pólipo hiperplásico, adenoma serrado sésil, y adenoma serrado tradicional (AST).

Los adenomas serrados son adenomas que en la evaluación microscópica presentan glándulas con una arquitectura serrada; es decir con pliegues intraluminales al interior de las criptas y en el epitelio de la superficie, lo que genera un aspecto estrellado, dentado ó serrado. Por esa particular arquitectura, pueden ser diagnosticados erróneamente como pólipos hiperplásicos (**Arévalo F 2012**).

##### **I.8.4.1.1 Pólipos hiperplásicos**

Comprenden del 70-80 % de todas las lesiones serradas (**Rosty and Bettington, 2013**). Se subclasifican en tres tipos: pólipo hiperplásico microvesicular, pólipo hiperplásico de células caliciformes y pólipo hiperplásico con depleción de mucina. El pólipo hiperplásico microvesicular es el más común (**Noffsinger AE, 2009**).

Aproximadamente el 75% de los HPs se localizan en el colon distal o recto como pequeñas lesiones sesiles (<10mm, normalmente 1-5mm), con un insignificante potencial maligno. Algunos pueden ser detectados en el colon proximal, posibilidad que se ha incrementado por el aumento de procedimientos endoscópicos (**Rosty and Bettington, 2013**).

El síndrome conocido como poliposis hiperplásica (poliposis serrada) fue descrito por primera vez en 1980 como poliposis metaplásica (**Williams GT, 1980**). Se

caracterizan por la presencia de múltiples pólipos hiperplásicos o pólipos serrados (**Rashid A et al, 2000**). Se trata de un síndrome poco diagnosticado que se desarrolla por la vía serrada, del cual no se conoce el gen implicado ni el patrón de herencia con que es transmitido (**Lindor NM, 2009; Rashid A et al, 2000**). Sin embargo, se ha identificado que la hipermetilación del gen *MGMT* es la alteración molecular más frecuente (**Boparai KS et al, 2008**).

El riesgo de CCR en estos pacientes puede llegar al 50% y pueden desarrollar múltiples cánceres sincrónicos y metacrónicos (**Jeevaratnam P et al, 1996; Bengoechea O et al, 1987; McCann BG, 1988; Shepherd NA, 1993; Teoh HH et al, 1989; Jass JR et al, 2000; Yao T et al, 2000; Hyman NH et al, 2004; Chow E et al, 2006**).

Los criterios diagnósticos sugeridos por la OMS para el diagnóstico de poliposis hiperplásica son: al menos 5 PH desde el colon proximal al colon sigmoide de los cuales dos deben ser mayores de 1 cm de diámetro, cualquier número de PH desde el colon proximal al sigmoide si el paciente es familiar en primer grado de un paciente con PH, 30 o más PH desde el colon proximal al colon sigmoide de cualquier tamaño.

#### **I.8.4.1.2 Adenoma serrado tradicional**

Representa el subtipo menos común y menos caracterizado de los pólipos serrados. Se localizan en el colon distal y recto. Cuando se encuentran en el colon proximal tienen una apariencia más sésil (**Noffsinger AE and Hart J, 2010**).

Algunos autores proponen que el AST y el ASS son biológicamente diferentes y fundamentan esta afirmación en el hecho de que el ASS se localiza con más frecuencia en colon proximal y el AST en colon distal; además, el ASS presenta con más frecuencia mutaciones en *BRAF* mientras que el AST lo hace en *KRAS* siendo las mutaciones *BRAF* y *KRAS* mutuamente excluyentes (**Rajagopalan et al 2002**).

#### **I.8.4.1.3 Adenoma serrado sésil**

En 1996, Tolakovic y Snover reconocieron que los pólipos hiperplásicos vistos en asociación con poliposis hiperplásica diferían morfológicamente de los pólipos hiperplásicos tradicionales. Posteriormente estos pólipos se llamaron adenomas serrados sesiles (**Noffsinger AE and Hart J, 2010**).

Representan el 12.1% de todos los pólipos y el 25.3% de los pólipos serrados. Se localizan con mayor frecuencia en el colon proximal y tienden a tener un tamaño >10mm. Se ha incrementado el reconocimiento de pequeños ASS y pueden encontrarse ASS de localización distal en el colon transverso (**Rosty and Bettington, 2013**).

La displasia no es una característica de los ASS. Cuando la displasia surge de la base de ASS, el pólipo se clasifica como ASS con displasia citológica. El desarrollo de displasia en ASS puede anunciar una progresión rápida a carcinoma ya sea por metilación de *MLHI* o alteración del gen *TP53* (**Rosty and Bettington, 2013**). Los ASS son lesiones similares a los PH, pero caracterizadas por tamaño mayor, alteraciones arquitecturales de las criptas, aumento de proliferación y han sido recientemente relacionadas con el carcinoma de colon MSI-H (**Goldstein et al, 2003; Torlakovic et al, 2003**).

#### **I.8.4.1.4 Adenoma serrado sésil con displasia (Pólipos mixtos)**

Hay una considerable superposición entre las características histológicas de los pólipos hiperplásicos, adenoma serrados sesiles y los adenomas serrados tradicionales, y algunos pólipos pueden contener componentes parecidos a distintos tipos de pólipos serrados (Noffsinger AE, 2009).

Los PH grandes del colon proximal con áreas con displasia (Rex and Ulbright, 2002) se denominan pólipos mixtos hiperplásicos-adenomatosos (Longacre TA and Fenoglio-Preiser CM, 1990).

La mayor parte de los pólipos mixtos asociados con CCR (86%) se localizan en el colon proximal y están asociados con la pérdida de expresión de genes como *MGMT* y *MLH1*. El 38% de estos carcinomas tienen morfología serrada y el resto (62%) morfología convencional (Oh et al, 2005).

#### **I.8.4.2. Alteraciones moleculares de la vía serrada**

La mayoría de los CS surgen en asociación con adenoma serrado tradicional y son MSS o muestran MSI-L. Entre el 15 al 20% de los CS surgen de pólipos serrados sesiles preexistentes. Estos son frecuentemente MSI-H, por lo que hay dos grupos de adenocarcinoma serrado biológicamente distintos que pueden delimitarse en función de sus lesiones precursoras y el grado de MSI que muestran. Estas dos formas difieren en su localización dentro del colon y en sus características moleculares (Noffsinger AE, 2009).

La vía del pólipo serrado representa una ruta alternativa a la vía supresora y se ha postulado que hay dos vías serradas paralelas. La predominante se caracteriza por localización en el colon proximal, mutaciones en *BRAF*, silenciamiento de *MLH1* y MSI-H, aunque una proporción son MSS. La otra vía del pólipo serrado se caracteriza por localización distal/rectal y mutaciones en *KRAS* y son MSS. Sin embargo, ciertos estudios recientes demuestran una incidencia de mutaciones en *KRAS* mayor que mutaciones en *BRAF* en CSs, lo cual sugiere que la mutación de *KRAS* es una alteración más importante que la de *BRAF* en la vía del pólipo serrado y está en claro contraste con la visión de muchos años de que las mutaciones de *BRAF* caracterizan el desarrollo del cáncer colorrectal a lo largo de la vía serrada (**García-Solano J et al, 2012b**). Así, el CS aparece como una entidad heterogénea a nivel molecular, compartiendo algunas características con el CC (alta frecuencia de mutaciones *KRAS*), mientras otros aspectos (mutación *BRAF*, fenotipo CIMP afectando a genes reparadores del ADN y MSI) son características típicas de carcinoma esporádico con inestabilidad para microsatélites (**Makinen MJ, 2007; García-Solano J et al, 2012b; Stefanius K et al, 2011; O'Brien MJ et al, 2006**). La tabla 4 resume las características moleculares de las distintas vías del CCR comentadas.

Sin embargo, hay solo una publicación que estudia la prevalencia de mutaciones en *KRAS* y *BRAF*, status MSI, MGMT, metilación de hMLH1 y la expresión de las proteínas MGMT y MLH1 en una serie de 42 pacientes finlandeses con CS (**Stefanius, 2011**).

Poco se conoce sobre la biología de los tumores serrados y hasta la fecha, hay únicamente un estudio de perfiles de expresión génica del CS mostrando que los genes

de participan en la morfogénesis, respuesta a la hipoxia y “asociados a membrana” se encuentran sobreexpresados (Laiho P et al, 2007).

Hereditario	Vía Inestabilidad Cromosómica	Vía Mismatch repair	Vía Serrada		Vía Híbrida
	Hereditario y esporádico	Hereditario (Síndrome Lynch)	Hereditaria y esporádica		Esporádico
Estado CIMP	Negativo	Negativo	Alto		Bajo
Estado MSI	MSS	MSS-H	MSI-H	MSI-L o MSS	MSI-L o MSS
Inestabilidad cromosómica	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
Mutación <i>KRAS</i>	Común	A veces	Ausencia	Ausencia	Común
Mutación <i>BRAF</i>	Ausencia	Ausencia	Común	Común	Ausencia
Estado MLH1	Normal	Mutado	Metilado	Metilación parcial	Normal
Metilación MGMT	Ausencia	Ausencia	A veces	Común	Común

**Tabla 4.** Clasificación molecular del CCR. (Adaptado de Noffsinger AE, 2009).

En resumen, la mayoría de las características clínicas y patológicas sugieren que los CS pueden ser más agresivos que los CC y además tienen peor pronóstico. La aparición de metástasis son más frecuentes en los CS y la supervivencia de los pacientes con CS es menor que la de los que padecen CC (García-Solano J et al, 2010). La caracterización molecular es importante para avanzar en el conocimiento de este tipo de tumor y de las posibles dianas terapéuticas.

También sería interesante facilitar la distinción entre CCR hMSI-H y CS como puntos finales de una ruta que comparten precursores. Es importante contar con marcadores moleculares e histológicos que nos faciliten la identificación del tipo de tumor con que nos encontramos.



## **II. OBJETIVOS**





## II. OBJETIVOS

- 1.- Analizar el perfil molecular y las funciones características de los CS mediante el estudio de análisis de perfiles de expresión por microarrays.
  
- 2.- Validar aquellos genes diferencialmente expresados entre el CS y CC obtenidos del estudio de microarrays a nivel de ARNm mediante PCR cuantitativa y a nivel de proteína mediante inmunohistoquímica.
  
- 3.- Validar aquellos genes diferencialmente expresados entre el CS y el CCR con criterios histológicos de hMSI-H obtenidos del estudio de microarrays a nivel de ARNm mediante PCR cuantitativa y a nivel de proteína mediante inmunohistoquímica.
  
- 4.- Analizar el posible valor diagnóstico y pronóstico de los marcadores encontrados y proponer posibles orientaciones terapéuticas



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**





### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **III.1. Características de los casos de CS, CC y hMSI-H**

Las muestras utilizadas en el estudio proceden del banco de tumores del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Santa Lucía, y corresponden a tumores y tejido circundante recogidos para su observación con fines diagnósticos. Los pacientes fueron debidamente informados de los estudios que se llevan a cabo en el laboratorio. Una parte de la muestra fue embebida en matriz para tejido congelado OCT (Optimal Cutting Temperatura), para facilitar su corte posterior, y congelada en isopentano para ser finalmente conservada en arcón a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El resto de la muestra fue incluida en parafina para su estudio morfológico e inmunohistoquímico en el laboratorio de Anatomía Patológica. Las muestras fueron clasificadas como tumorales (CC, CS y MSI) y normales (CC, CS y MSI), dependiendo del tumor al que rodeaban).

Las muestras utilizadas fueron clasificadas por género (masculino y femenino), edad, localización (proximal, distal/recto), estadio Dukes (A, B, C), clasificación TNM, (T: T2, T3, T4; N: N0, N1, N2; M: MX, M1), grado WHO (alto, bajo) y tipo (mucinoso, no mucinoso).

#### **III.2. Extracción y cuantificación de los ARNm**

##### ***Extracción del ARN***

Se extrajo un volumen de unos  $10\text{ mm}^3$  de cada muestra de tejido congelado usando un sacabocados estéril y desechable Acupunch 2mm (AcudermInc, Lauderdale). Se extrajo el ARN siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Germany). Brevemente, el tejido se disgregó y se homogeneizó en  $700\ \mu\text{l}$  de Qiazol

(Qiagen, Hilden, Germany) con un disgregador de tejido TissueRuptor, (Qiagen, Hilden, Germany) durante 20 segundos. El homogeneizado se incubó a temperatura ambiente 5 min. Después se añadieron 140 µl de cloroformo y la mezcla se centrifugó a 12.000 x g 15 min a 40°C. De la fase acuosa superior se tomaron 350 µl que se sometieron a la extracción automática de ARN total utilizando el equipo Qiacube y el miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Dicho protocolo se basa en la unión específica del ARN a unas membranas de sílice de unas columnas de centrifugación. El ARN ligado a las membranas se eluyó con 50 µl de agua sin ARNasas. Las muestras se conservaron a -80 °C.

La concentración del ARN se determinó por la absorbancia a 260 y 280 nm mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA), y la calidad del ARN analizando el grado de fragmentación en un ARN 6000 Pico Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### ***Hibridación en microarray***

El ARN (150 ng) se concentró en un SpeedVac a una dilución de trabajo y se utilizó para producir 3-CTP cARN marcada con cianina utilizando el Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Agilent p / n 5190-2305), de acuerdo con el protocolo de “One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis” de la versión 6.0 (Agilent p / n G4140-90040). Este método utiliza ARN polimerasa T7 que, simultáneamente, amplifica e incorpora cianina-3 marcada con CTP. Posteriormente se procedió a la hibridación de 2.000 ng de cARN obtenido utilizando el Kit Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent p / n G2519F-014850) que contiene más de 41.000 genes

humanos y transcritos. Los arrays fueron escaneados en un Scanner Microarrays Agilent (Agilent G2565BA), de acuerdo con el protocolo del fabricante y los datos extraídos utilizando Agilent Feature Extraction Software 10.7.1 siguiendo la plantilla de cuadrícula Agilent 014850\_D\_F\_20100430 protocolo GE1\_107\_Sep09 y el QC Metric Set GE1\_QCMT\_Sep09.

### ***Análisis de los datos del microarray***

Los datos brutos obtenidos fueron inicialmente procesados usando “Agilent background correction” y se aplicó normalización por cuartiles para obtener en todas las muestras una escala homogénea. El análisis de expresión diferencial se realizó con los datos normalizados utilizando Linear Models for Microarray Data (Limma) incluidos en el paquete Bioconductor (disponible en: [www.bioconductor.org/packages/2.3/bioc/html/limma.html](http://www.bioconductor.org/packages/2.3/bioc/html/limma.html)). La comparación se realizó entre CS (n = 11) y CC (n = 15) y entre shMSI-H (n =4) y CS (n=11). Las características de las muestras utilizadas para el estudio por microarrays se detallan en la tabla 1.

<b>Análisis microarray</b>						
	<b>CS n=11</b>	<b>CC n=15</b>		<b>CS n=11</b>	<b>hMSI-H n=4</b>	
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>p</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>p</b>
<b>Género</b>						
Femenino	5 (45.5)	8 (53.3)		5 (45.5)	4 (100)	
Masculino	6 (54.5)	7 (46.7)	0.691	6 (54.5)	0 (0)	0.029
<b>Edad (SD)</b>	65.1 [22.4]	68 [10.2]	0.660	65.1[22.4]	61 [22.6]	0.759
<b>Localización</b>						
Proximal	9 (81.8)	9 (60.0)		9 (81.8)	4 (100)	

Distal/recto	2 (18.2)	6 (40.0)	0.234	2 (18.2)	0 (0)	0.360
<b>Estadio Dukes</b>						
<b>A</b>	3 (27.3)	3 (20.0)		3 (27.3)	0 (0)	
<b>B</b>	1 (9.1)	2 (13.3)		1 (9.1)	2 (50)	
<b>C</b>	7 (63.6)	10 (66.7)	0.881	7 (63.6)	2 (50)	0.162
<b>Clasificación TNM</b>						
<b>T</b>						
T2	4 (36.4)	3 (20)		4 (36.4)	0 (0)	
T3	2 (18.1)	9 (60)		2 (18.1)	3 (75)	
T4	5 (45.5)	3 (20)	0.101	5 (45.5)	1 (25)	0.100
<b>N</b>						
N0	4 (36.4)	5 (33.3)		4 (36.4)	2 (50)	
N1	1 (9.1)	6 (40)		1 (9.1)	1 (25)	
N2	6 (54.5)	4 (26.7)	0.169	6 (54.5)	1 (25)	0.537
<b>M</b>						
MX	10 (90.9)	15 (100)		10 (90.9)	3 (75)	
M1	1 (9.1)	0 (0)	0.234	1 (9.1)	1 (25)	0.423
<b>Grado WHO</b>						
Alto	1 (9.1)	1 (6.7)		1 (9.1)	0 (0)	
Bajo	10 (90.9)	14 (93.3)	0.819	10 (90.9)	4 (100)	0.533
<b>Tipo</b>						
No mucinoso	4 (36.4)	11 (73.3)		7 (63.6)	2 (50)	
Mucinoso	7 (63.6)	4 (26.7)	0.058	4 (36.4)	2 (50)	0.634

**Tabla 1.** Características demográficas y patológicas de los casos estudiados por microarray entre CS y CC y entre CS y CCR hMSI-H.

Los valores de p se corrigieron utilizando un test múltiple, el método de Benjamini y Hochberg para dar valores p ajustados. Con el fin de identificar mejor las distintas funciones celulares entre CS y CC, los datos de expresión génica se analizaron mediante Gene Set Enrichment Analysis (GSA) con la herramienta FatiScan de Babelomics (disponible en: [www.babelomics.org](http://www.babelomics.org)). Esta metodología busca conjuntos de genes funcionalmente relacionados que muestran una expresión de comportamiento coordinada.

GSA es una metodología de perfiles funcionales que se basa en el comportamiento coordinado de conjuntos de genes relacionados funcionalmente más que en la selección de un número de genes expresados diferencialmente. Utilizamos diferentes bases de datos funcionales de anotaciones, concretamente las vías de la base de datos KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto) (disponibles en: [www.genome.jp / KEGG](http://www.genome.jp/KEGG)) y el proceso biológico, función molecular y componente celular de Gene Ontology (GO) (disponible en: [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)). Los resultados de las rutas KEGG fueron representados por una red mediante el software Cytoscape (disponible en: <http://www.cytoscape.org/>). Cada nodo representa una vía cuyo tamaño está asociado con el número de genes incluidos en esta vía y el espesor de la conexión representa el número de genes compartidos entre dos nodos. Algunas de las rutas KEGG fueron representadas mediante Paintomics, que es una herramienta web que permite la integración y visualización de datos de transcriptómica y metabolómica (disponible en: <http://www.paintomics.org>).

Con el fin de mantener el grado de confianza de las funciones diferencialmente expresadas, cuando los resultados GO mostraron más de cincuenta

funciones/proceso/componentes, se seleccionaron aquellas para las que las diferencias de expresión génica eran mayores, limitando a aquellas que se encontraban tanto en el percentil 0,04 como en el percentil 0,96 del ranking de genes diferencialmente expresados para la comparación de CS y CC y para la de CS y CCR hMSI-H.

### ***Transcripción inversa (retrotranscripción)***

Si la concentración de ARN era suficientemente alta, la reacción de RT se realizó con 5 µg de ARN. Para las muestras con baja concentración de ARN, se realizó la reacción con el ARN presente en un volumen máximo de 7 µl.

A continuación explicamos los dos métodos que utilizamos según el gen a estudio: para la Fascina, antes de la retrotranscripción, se trató el ARN con ADNasa I para eliminar la posible contaminación con ADN, para ello se utilizó el kit AMPD1-1KT de Sigma (S. Louis, MO, USA). En tubos “thinwall”, específicos para PCR y libres de ARNasas, se colocaron 6,5 µl de la disolución de ARN, 1 µl de tampón de retrotranscripción 10x y 2 µl de ADNasa I. Después de incubar la mezcla durante 30 min, añadimos 1 µl de EDTA. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler de Eppendorf (Sao Paulo, Brasil). En primer lugar, la mezcla anterior se calentó durante 10 min a 70°C para desnaturalizar el ARN y eliminar las estructuras secundarias que impiden la unión de los cebadores; después se introdujo en hielo y se añadió 9,5 µl de una mezcla de reacción conteniendo: tampón de reacción, DTT (Dithiothreitol), cebadores al azar (random primers), la mezcla de dNTPs e el inhibidor de ribonucleasas. Se agitó para mezclar los reactivos y se calentó a 42°C durante 2 min. Posteriormente, se añadió 1 µl de retrotranscriptasa M-MLV, calentando 50 min a 42°C

para que se sintetizara el ADNc. Finalmente, la muestra se calentó 10 min a 72°C para acabar de sintetizar los fragmentos de ADNc y se guardó a -20°C.

Para el resto de genes, se utilizó el kit para sintetizar ADNc por qRT-PCR de Thermo Scientific DyNAmo (Waltham, MA, USA). En tubos “thinwall”, específicos para PCR y libres de ARNasas, se colocaron 7 µl de la disolución de ARN, 10 µl de tampón de retrotranscripción 2x, 2 µl de MMuLV Transcriptasa y 1µL de OligodT. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler de Eppendorf (Sao Paulo, Brasil) con los siguientes pasos:

Unión de Cebadores	25 °C	10 min
Síntesis de ADNc	37 °C	30 min
Reacción de terminación	85°C	5 min
Mantenimiento de la muestra	4°	∞

### ***Diseño de los cebadores***

Para Fascina, el diseño de los cebadores (primers) para amplificar de forma específica Fascina1 se realizó mediante la aplicación online Primer-BLAST. La secuencia de nucleótidos del ARNm de Fascina1 utilizada fue la obtenida de la base de datos RefSeq del NCBI (NM\_003088.2). Se seleccionó de manera que al menos uno de los cebadores estuviera en una unión entre exones (Fascina1 posee 5 exones). De entre los resultados de la búsqueda, se escogieron dos parejas de cebadores. En la Tabla 2 se muestran las secuencias y los exones con los que hibridan cada uno de ellos, junto con la secuencia de los cebadores de β-actina, que se utilizó como referencia.

Los cebadores de β-actina se obtuvieron de la base de datos RT Primer DB (**Pattyn F et al, 2006**) mientras que para los genes restantes se utilizó el programa online Primer 3 (**Untergrasser A et al, 2007**).

ARNm		Secuencia de cebadores (5'-3')	Amplicón (pb)
CRCP	Fw	GCCACAAGTTGACCAAAGCT	97
	Rv	CCGCTCTTCACTCTCTCCA	
CXCL14	Fw	CTACAGCGACGTGAAGAAGC	84
	Rv	ACGCTCTTGGTGGTGATGAT	
CSF3R	Fw	ATTCTGTGGAGACTGGGAGC	120
	Rv	GGAGAGAAAGGCCTGAGTGT	
ICAM1	Fw	GTGACCGTGAATGTGCTCTC	82
	Rv	CCTGCAGTGCCCATATGAC	
FASCINA1	Fw	TCCACGCGCCAGGGTATGGAC	121
	Rv	ACTTGCCCGTGTGGGTACGG	
FASCINA1*	Fw	GCGACTGCGAGGGCCGTTAC	172
	Rv	AGGTCCATACCCTGGCGCGTG	
β-ACTINA**	Fw	AGAAAATCTGGCACCACACC	142
	Rv	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	
B-ACTINA***	Fw	GAGCTACGAGCTGCCTGACG	122
	Rv	GTAGTTTCGTGGATGCCACAG	
RHOA	Fw	CGGGAGCTAGCCAAGATGAAG	158
	Rv	CCTTGCAGAGCAGCTCTCGTA	
RHOC	Fw	CCTCATGTGCTTCTCCATCGA	136
	Rv	CTCGTCTTGCCTCAGGTCCTT	
RAC3	Fw	GAGAATGTTTCGTGCCAAGTG	110
	Rv	TCAATGGTGCCTTGTCGTC	
RHOV	Fw	TCTCTGTGCAAGTCCTGGTG	81
	Rv	TCGGTCAAATCCTCCTGTC	
CDC42	Fw	GGCTGTCAAGTATGTGGAGTGTTT	86
	Rv	GCTCCAGGGCAGCCAAT	
HPCA	Fw	AGGAGATGCTGGAGATCGTG	153
	Rv	TGAACTCCTCCAAGGACAGC	
DAG1	Fw	GCCTGACTTTAAGGCCACAAGCAT	103
	Rv	CGCCTCTGAGGGCACTCT	

\*: Se utilizaron dos parejas de cebadores de Fascina1 para comprobar que la amplificación era correcta.

\*\* : utilizada en los estudios de Fascina1.

\*\*\* utilizada para el resto de genes.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en las PCRs.

### ***PCR cuantitativa***

El primer paso para realizar la PCR cuantitativa (qPCR) fue comprobar la eficiencia de amplificación de cada gen. Para  $\beta$ -actina se realizaron 3 diluciones de ADNc por cada muestra: 1/10, 1/50 y 1/250. Para el resto de genes se realizaron tres diluciones a distintas concentraciones de ADNc: 0.5 uL, 1uL y 1,5uL. Las diferentes diluciones permitieron comprobar que la eficiencia de la PCR en todos los casos era cercana al 1 y se trabajó con 1 uL de ADNc en las determinaciones posteriores.

Las condiciones establecidas en el programa para la búsqueda de cebadores fueron las siguientes:

- El fragmento a amplificar o amplicón, tendrá un tamaño de entre 150 o 300 pares de bases (pb).
- Un contenido de G-C (guanina-citosina) en un rango de 60%.
- La temperatura de desnaturalización entre 58-60°C.
- La longitud de los cebadores entre 20pb.

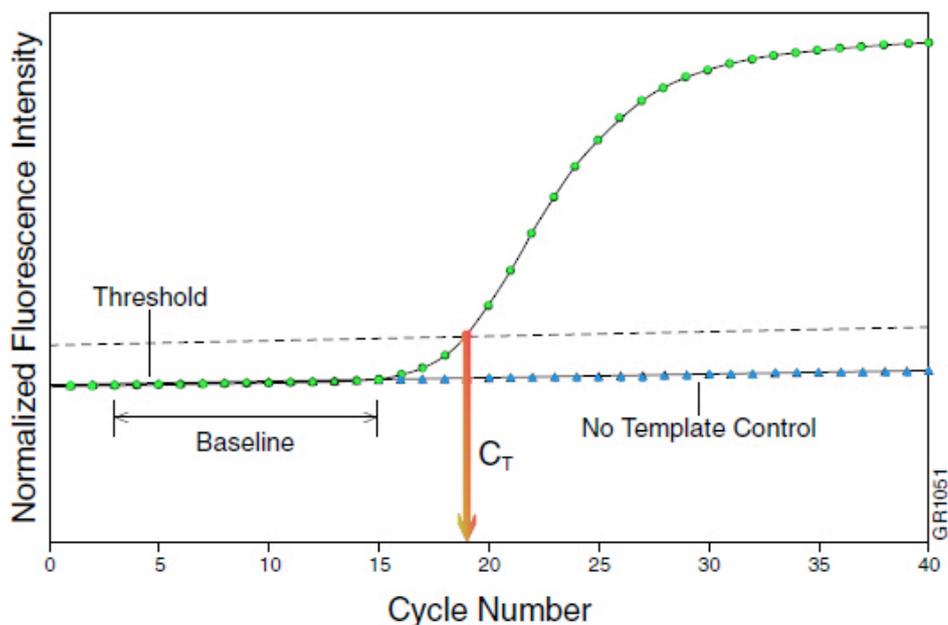
Para la realización de las determinaciones de este trabajo se prepararon las mezclas de reacción para amplificar los ADNc de los genes a estudio y  $\beta$ -actina como gen constitutivo o "housekeeping", que llevaban los cebadores correspondientes y una mezcla maestra que contenía ADN polimerasa, dNTPs y SYBR Green (Applied Biosystems) (en el caso de la Fascina1) y de Qiagen (para el resto de genes) .

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos MicroAmpOptical (Applied Biosystems, Foster city, CA) con 20  $\mu$ l de volumen de reacción: 5  $\mu$ l de las diluciones variables de ADNc y 15  $\mu$ l de mezcla de reacción. La concentración final de los

cebadores fue de 0,2  $\mu$ M. Para la amplificación se usó el termociclador 7500 de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). La reacción incluía un primer paso de 10 min a 95°C para activar la polimerasa, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C. Se añadió un paso final de disociación para analizar las curvas de fusión del ADN. El SYBR Green es un agente intercalante que aumenta su emisión de fluorescencia cuando se une al ADN de doble cadena.

Para cada gen, se determina un umbral de fluorescencia (threshold) de manera que corresponda al principio de la fase exponencial de la amplificación. La fluorescencia se representa en una gráfica como número de ciclo vs fluorescencia (Figura 1). Se determina el número de ciclo en el punto de corte entre el umbral y la fluorescencia. Con esto obtenemos el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia llegue a este umbral, el cual se denomina Ct, y es el parámetro que nos permita realizar la cuantificación. Cuanto menor sea el Ct de una muestra, mayor será la cantidad de producto inicial de la misma, ya que habrá alcanzado el umbral de fluorescencia considerado como específico en un menor número de ciclos y esto se puede extrapolar a la abundancia del cada ARNm que se fue retrotranscrito a ADNc.

La cantidad de cada transcrito se calculó por comparación del Ct del gen con el Ct de  $\beta$ -actina. La relación entre ambos ARNms viene dada por  $2^{-\Delta Ct}$  (técnica de la cuantificación relativa), en donde  $\Delta Ct$  es la diferencia entre el Ct (nº ciclos de la PCR para alcanzar el umbral de fluorescencia) para el producto del gen investigado y el Ct para el producto de  $\beta$ -actina a la misma dilución que sirvió como control. Estos valores de cuantificación permitían la comparación de las muestras entre si.

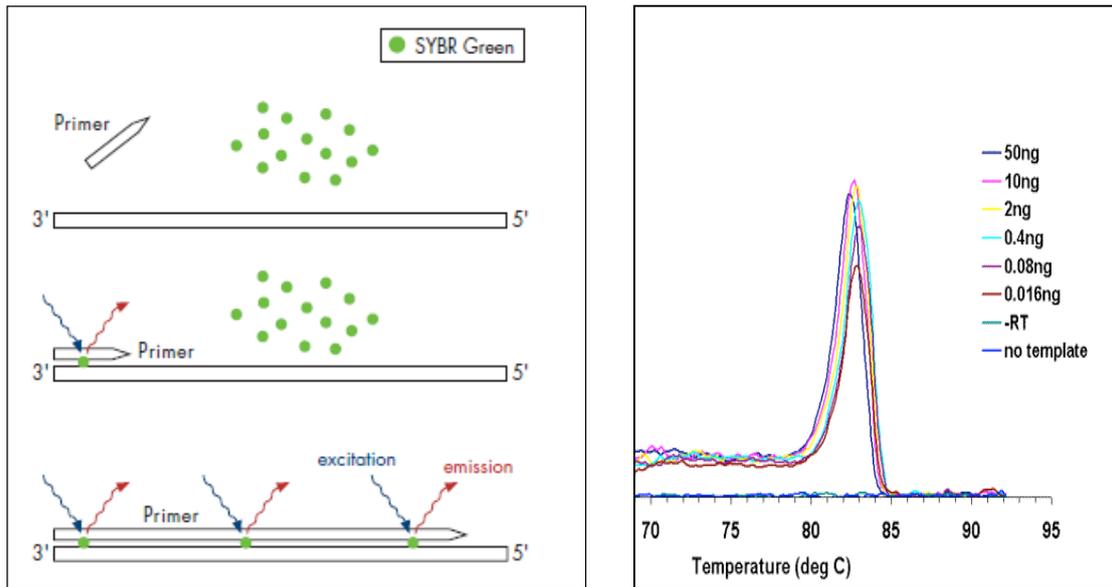


**Figura 1.-** Ejemplo tipo de resultados para un ensayo de PCR cuantitativa. Se muestra la curva de fluorescencia que se obtendría con la muestra (sample) y con un control sin ADNc (no template control). La línea base (baseline) es la fluorescencia basal detectada y el  $C_T$  es el número del ciclo en el que ocurre la intersección de la curva de fluorescencia con el umbral de fluorescencia (threshold, línea discontinua). Cuando mayor es la abundancia de un transcrito, menor resulta el  $C_T$  obtenido.

Para optimizar las condiciones del ensayo, se hizo un barrido previo con una matriz de cebadores con concentraciones de 50, 300 y 900 nM para cada pareja y varias concentraciones de ADNc. Como la sonda fluorescente empleada fue SYBRgreen que se une inespecíficamente a ADN de doble hebra (figura 2B), se incluyó al final de cada programa de PCR una curva de disociación para comprobar que se había amplificado un único producto. Además, el tamaño correcto de los fragmentos se comprobó con una electroforesis con matrices de separación de ADN de alta resolución.

A

B



**Figura 2-** A.-Principio del ensayo de PCR cuantitativa con SYBRgreen. EL SYBRgreen se intercala en la doble cadena sintetizada por la polimerasa. Mientras que su rendimiento cuántico es muy bajo en estado libre, la forma intercalada emite luz fluorescente. B.- Ejemplo de curva de disociación que permite comprobar que únicamente se ha obtenido un producto de amplificación.

Las características de las muestras utilizadas para la PCR cuantitativa se detallan en la tabla 3 y tabla 4.

	PCR cuantitativa					
	GTPasas		p	FSCN1, HPCA, DAG1		
	CS n=19	CC n=19		CS n=23	CC n=22	p
	(%)	(%)	(%)	(%)		
<b>Género</b>						
Femenino	9 (47.4)	10 (52.6)		11 (47.8)	11 (50)	
Masculino	10 (52.6)	9 (47.4)	0.746	12 (52.17)	11 (50)	0.884
<b>Edad (SD)</b>	66.4 [9.69]	65.2 [11.41]	0.820	64.3 [11.78]	65.5 [11.08]	0.782
<b>Localización</b>						

Proximal	11 (57.9)	9 (47.4)		14 (60.9)	9 (40.9)	
Distal/recto	8 (42.1)	10 (52.6)	0.516	9 (39.1)	13 (59.1)	0.181
<b>Estadio Dukes</b>						
<b>A</b>	4 (21.1)	2 (10.5)		2 (8.7)	3 (13.6)	
<b>B</b>	2 (10.5)	6 (31.6)		4 (17.4)	5 (22.7)	
<b>C</b>	13 (68.4)	11 (57.9)	0.243	17 (73.9)	14 (63.6)	0.428
<b>Clasificación TNM</b>						
<b>T</b>						
T2	6 (31.6)	3 (15.8)		7 (30.4)	3 (13.6)	
T3	8 (42.1)	14 (73.7)		9 (39.1)	14 (63.6)	
T4	5 (26.1)	2 (10.5)	0.141	7 (30.4)	5 (22.7)	0.223
<b>N</b>						
N0	6 (31.6)	8 (42.1)		6 (26.1)	8 (36.4)	
N1	7 (36.8)	6 (36.6)		7 (30.4)	5 (22.7)	
N2	6 (31.6)	5 (26.3)	0.797	10 (43.5)	9 (40.9)	0.723
<b>M</b>						
MX	18 (94.7)	18 (94.7)		22 (95.7)	21 (95.5)	
M1	1 (5.3)	1 (5.3)	1.000	1 (4.3)	1 (4.5)	0.974
<b>Grado WHO</b>						
Alto	2 (10.5)	1 (5.3)		2 (8.7)	1 (4.5)	
Bajo	17 (89.5)	18 (94.7)	0.547	21 (91.3)	21 (95.5)	0.577
<b>Tipo</b>						
No mucinoso	10 (52.6)	15 (78.9)		15 (65.2)	16 (72.72)	
Mucinoso	9 (47.4)	4 (21.1)	0.087	8 (34.8)	6 (27.27)	0.586

**Tabla 3.** Características demográficas y patológicas de los casos estudiados para la validación mediante qPCR de los genes *RHOA*, *RHOC*, *RHOV*, *CDC42* y *RAC3* entre CS y CC y *Fascina1*, *Hipocalcina*,  $\beta$ -Distroglicano entre CS y CC.

	PCR cuantitativa					
	GTPasas			CXCL14, CSF3R, CRCP, ICAM1		
	CS n=18	hMSI-H n=9	p	CS n=23	hMSI-H n=9	p
	(%)	(%)		(%)	(%)	
<b>Género</b>						
Femenino	11 (61.1)	8 (88.9)		10 (43.5)	7 (77.8)	
Masculino	7 (38.9)	1 (11.1)	0.136	13 (56.5)	2 (22.2)	0.080
<b>Edad (SD)</b>	64.4 [10.46]	66.7 [15.39]	0.407	68.5 [15.99]	66.4 [15.22]	0.942
<b>Localización</b>						
Proximal	11 (61.1)	9 (100)		16 (69.6)	9 (100)	
Distal/recto	7 (38.9)	0 (0)	0.030	7(30.4)	0 (0)	0.061
<b>Estadio Dukes</b>						
<b>A</b>	4 (22.2)	0 (0)		4 (17.4)	0 (0)	
<b>B</b>	2 (11.1)	3 (33.3)		4 (17.4)	4 (44.4)	
<b>C</b>	12 (66.7)	6 (66.7)	0.165	15 (65.2)	5 (55.6)	0.169
<b>Clasificación TNM</b>						
<b>T</b>						
T2	5 (27.8)	0 (0)		6 (26.1)	0 (0)	
T3	8 (44.4)	5 (55.6)		11 (47.8)	6 (66.7)	
T4	5 (27.8)	4 (44.4)	0.207	6 (26.1)	3 (33.3)	0.234
<b>N</b>						
N0	6 (33.3)	3 (33.3)		8 (34.8)	4 (44.4)	
N1	5 (27.8)	2 (22.2)		7 (30.4)	1 (11.11)	
N2	7 (38.9)	4 (44.4)	0.943	8 (34.8)	4 (44.4)	0.525
<b>M</b>						
MX	17 (94.4)	6 (66.7)		23 (100)	6 (66.7)	
M1	1 (5.6)	3 (33.3)	0.055	0 (0)	3 (33.3)	0.004
<b>Grado WHO</b>						
Alto	5 (27.8)	0 (0)		12 (52.2)	0 (0)	
Bajo	13 (72.2)	9 (100)	0.080	11 (48.8)	9 (100)	0.006

**Tipo**

No mucinoso	10 (55.6)	(66.7)		13 (56.5)	6 (66.7)	
Mucinoso	8 (44.4)	3(33.3)	0.580	10 (43.5)	3 (33.3)	0.597

**Tabla 4.** Características demográficas y patológicas de los casos utilizados para la qPCR de los genes *RHOA*, *RHOC*, *RHOV*, *CDC42* y *RAC3* entre CS y CCR hMSI-H y *CXCL14*, *CSF3R*, *CRCP* y *ICAM1* entre CS y hMSI-H.

### III.3. Técnica de Inmunohistoquímica

Para Fascina1, Hipocalcina y  $\beta$ -Distroglicano la validación se llevó a cabo con 70 CSs y 70 CCs emparejados por edad, sexo, localización, grado y estadio Dukes (tabla 4) y un subgrupo adicional de 20 hMSI-H CCR. Para evaluar la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP) se utilizaron un subconjunto aleatorizado de 39 CSs, 32 CCs y 18 hMSI-H. Para los anticuerpos CRCP, CXCL14 e ICAM 1 se utilizaron 10 CSs y 15 hMSI-H emparejadas por edad, sexo, localización y estadio Dukes (Tabla 5).

	Inmunohistoquímica		p	Inmunohistoquímica		
	CS n = 70	CC n = 70		CS n=10	hMSI-H n=15	p
	(%)	(%)		(%)	(%)	
<b>Género</b>						
Femenino	36 (51.4)	37 (52.9)		7 (70)	8 (53.3)	
Masculino	34 (48.6)	33 (47.1)	0.866	3 (30)	7 (46.7)	0.405
<b>Edad (SD)</b>	67.6 [13.6]	68.5 [13.5]	0.951	71.5 [8.8]	66.3 [14.0]	0.449
<b>Localización</b>						
Proximal	39 (55.7)	37 (52.9)		8 (80)	14 (93.3)	
Distal/recto	31 (44.3)	33 (47.1)	0.734	2 (20)	1 (6.7)	0.315

**Estadio Dukes**

A	8 (11.5)	8 (11.4)		0 (0)	0 (0)	
B	26 (37.1)	28 (40.0)		2 (20)	6 (40)	
C	36 (51.4)	34 (48.6)	0.937	8 (80)	9 (60)	0.294

**Grado WHO**

Alto	5 (7.1)	3 (4.3)		4 (40)	1 (6.7)	
Bajo	65 (92.9)	67 (95.7)	0.467	6 (60)	14 (93.3)	0.041

**Tipo**

No mucinoso	55 (78.6)	60 (85.7)		8 (80)	12 (80)	
Mucinoso	15 (21.4)	10 (14.3)	0.270	2 (20)	3 (20)	1.000

**Tabla 5.** Características demográficas y patológicas de los casos utilizados en la inmunohistoquímica para Fascina1, Hipocalcina y  $\beta$ -Distroglicano (CS y CC), y para CRCP, CXCL14 e ICAM1 (CS y CCR hMSI-H).

Se seleccionaron partes representativas del tumor para su inclusión por duplicado en micromatrices de tejidos empleando el TissueArrayer de Beecher. Posteriormente se realizaron cortes de 2,5  $\mu$ m para realizar la tinción inmunohistoquímica. La inmunotinción se realizó en un equipo Autostainer link48 (Dako, Glostrup, Dinamarca).

La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5% durante 5 minutos. Después de la incubación con el anticuerpo primario se trató con polímero marcado con peroxidasa (Envision FLEX/HRP, Dako), durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para visualizar los antígenos, los cortes se sumergieron en dos baños fríos con 3,3'-diamino-benzidina (DAB) (Envision Flex + DAB cromógeno,

Dako) de forma consecutiva durante 5 minutos cada uno, y fueron contrastados con hematoxilina de Harris durante 5 minutos.

La información sobre los anticuerpos, el equipamiento y los procedimientos inmunohistoquímicos para las tinciones de Fascina1, Hipocalcina,  $\beta$ -Distroglicano y NAIP se detallan en la tabla 6.

Anticuerpo	Fascina1	Hipocalcina	$\beta$ -Distroglicano	NAIP
Equipamiento	Autostainer link48 Dako (Via Real, CA, USA)			
Proveedor de Ac	Dako (Dako, Glostrup, Denmark)	Abgent (San Diego, CA, USA)	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	R&D systems (Minneapolis, MN, USA)
Código	M356701-8	AP1564A	SC-33702	MAB829
<b>Recuperación antigénica:</b>				
Buffer	Citrato	Tris/EDTA	Tris/EDTA	Citrato
pH	6.1	9	9	6.1
T °C	95	95	95	95
Tiempo	20	20	40	20
Dilución AC	1:100	1:100	1:100	1:100
Incubación	40	90	300	300
Clon	55K-2	Policlonal	4F7	541609

**Tabla 6.** Información sobre anticuerpos, equipamiento y procedimientos inmunohistoquímicos de Fascina1, Hipocalcina,  $\beta$ -Distroglicano y NAIP.

Para Fascina1, CRCP, CXCL14 e ICAM1 una tinción difusa citoplásmica en las células epiteliales del tumor se consideró una reacción positiva, mientras que para Hipocalcina, NAIP y  $\beta$ -Distroglicano se consideró positiva la tinción citoplasmática granular en el borde luminal. La expresión inmunohistoquímica de Fascina1 en el

endotelio vascular se utilizó como control interno positivo y la ausencia de expresión en la mucosa normal como negativo. Para hipocalcina y NAIP se utilizaron como control positivo secciones de cerebro embebidas en parafina.

Anticuerpo	ICAM1	CRCP	CXCL14
<b>Kit Optiview DAB IHC V5</b>	Ventana, Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd) Basel, Suiza		
<b>Proveedor de Ac</b>	Cell Signaling Technology®	Sigma-Aldrich (S. Louis, MO, USA).	Abcam®
<b>Código</b>	#4915	HPA007216	ab36622
<b>Recuperación antigénica:</b>			
Buffer	CC2	CC1	CC1
pH	6	8,4	8,4
T °C	95	95	95
Tiempo	52	52	52
<b>Dilución AC</b>	1:300	1:350	1:100
<b>Incubación</b>	0/N	0/N	0/N
<b>Clon</b>	Policlonal	Policlonal	Policlonal

**Tabla 7.** Información sobre anticuerpos, equipamiento y procedimientos inmunohistoquímicos de ICAM1, CRCP y CXCL14.

La calificación de la tinción de estos marcadores se calculó multiplicando la puntuación de intensidad de la tinción (0 =sin tinción, 1 = débil, 2 = moderada, 3 = fuerte) en una zona tumoral por puntuación del área teñida (0 =sin tinción, 1 <un tercio, 2 = entre uno y dos tercios, 3 = dos tercios). La puntuación inmunohistoquímica total (0-6) se expresó como el producto de las puntuaciones de intensidad y de área. La tinción se consideró positiva si la puntuación era >2.

### **III.4. Técnicas de análisis de proteína por Western Blot**

#### **Líneas celulares**

Las líneas celulares de adenocarcinoma de colon (DLD-1, HCT-15, SW620, SW480, HCT116, LS174T, HT-29, LOVO y CACO2) se obtuvieron de la colección Americana de cultivos (ATCC, American Type Culture Collection). La línea celular tumoral HGUE-C-1 fue establecida en el laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Elche a partir de líquido ascítico de un paciente de 76 años de edad con cáncer de colon y fueron donadas por el Dr. Miguel Saceda (Grasso S et al, 2015).

#### ***Preparación de extractos y contenido en proteína***

Para la extracción de proteínas con fines analíticos, las células se lavaron dos veces con PBS frío para eliminar restos de medio y suero. Con 1 ml de PBS se recogieron las células con el “scraper” en un Eppendorf frío. Este proceso se repitió dos veces. Se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga tipo Eppendorf a 4° C. El pellet se resuspendió con 1 ml de PBS y se volvió a centrifugar otros 5 minutos. Después se añadió tampón de lisis (1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 mM EDTA, 30 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 50 mM NaF, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4,) y se incubó en hielo durante 30 minutos para lisar las células. Tras centrifugar a 16.000 rpm en una centrífuga tipo Eppendorf, durante 30 min a 4°C se recogió el sobrenadante para su análisis posterior y para determinar el contenido de proteína de los lisados celulares utilizando el reactivo Bradford ProteinAssay (Bio-Rad). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como patrón para la obtener la recta de calibrado. Este es un ensayo colorimétrico basado en el cambio de absorbancia del colorante azul de Coomassie Brillante G-250 cuando éste

se une a las proteínas. El cambio de absorbancia a 595nm es dependiente y proporcional de la concentración de proteínas.

### ***Electroforesis analítica de proteínas***

Las muestras fueron diluidas en tampón de muestra (5x) y separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE (“Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrilamide Gel Electrophoresis”), empleando para ello una cubeta Mini Protean III de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories,). Los geles estaban compuestos por dos porciones: el gel concentrador, de 1 cm de altura, aproximadamente, con una concentración final de acrilamida del 4,5% que se utiliza para concentrar la muestra, y el gel separador de unos 6 cm de altura, con un porcentaje de acrilamida del 7,5% que permite separar las proteínas (Tabla 8).

<b>Componentes</b>	<b>Gel concentrador</b>	<b>Gel separador</b>
<b>Agua destilada Milli Q(ml)</b>	3.05	4.7
<b>Tris 1.5M pH8.8 (ml)</b>	1.25	2.5
<b>SDS 10% (µL)</b>	50	100
<b>Poliacrilamida (ml)</b>	0.65	2.5
<b>PSA (µL)</b>	60	70
<b>TEMED (µL)</b>	7	87

**Tabla 8.** Componentes del gel concentrador y del gel separador. (SDS: dodecil sulfato de sodio, PSA: persulfato amónico, TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletileno diamina).

El volumen de proteína separado varió en función de su concentración con el fin de obtener una cantidad de proteína celular de 80µg. La proteína se mezcló con “Sample buffer” 5x (312.5 mM Tris pH 6.8, 10 % SDS, 50 % glicerol, 0.5 % (p/v) azul de bromofenol y 5 % β-Mercaptoetanol) y se igualaron los volúmenes de las calles con tampón de lisis. La muestra se incubó a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. El volumen máximo de muestra aplicado en cada calle fue de 34µl. En cada gel se cargó un marcador de tamaño para determinar el tamaño de la proteína a estudio. La intensidad de corriente aplicada durante la electroforesis fue 80 V hasta que el frente de la muestra entró en el gel separador y posteriormente de 130V. Una vez que el frente salió del gel separador se detuvo la corriente, y se procedió a la detección inmunoquímica mediante transferencia Western de las proteínas separadas por peso molecular.

### ***Transferencia Western***

Una vez finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia de proteínas mediante la formación de un sándwich compuesto por el gel, una membrana de nitrocelulosa, dos esponjas y dos láminas de papel absorbente (Whatman®). Todo se sumergió en el buffer de transferencia compuesto de 250 ml Buffer de transferencia 4X (25 mM Trizma base, 192 mM Glicina, 20 % de metanol, pH 8.6), 200 ml metanol, 550 ml de H<sub>2</sub>O). Estas membranas tienen carga positiva por lo que, aplicando una diferencia de potencial, las proteínas migran hacia ella y quedan inmovilizadas. Este proceso requiere aproximadamente 1 hora y 30 minutos, y se realiza a un voltaje de 100 V y a una temperatura de 4° C.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se procedió al bloqueo de la membrana. Para ello, la membrana fue incubada con leche desnatada en polvo al 5% reconstituida en tampón TBST (Tris, NaCl y 0,05% Tween 20), durante una hora a temperatura ambiente en agitación orbital muy suave. Durante el bloqueo, las proteínas de la leche se unen inespecíficamente a todas las porciones de la membrana que no hayan absorbido proteínas. De esta forma, se evita la unión inespecífica de los anticuerpos a usar, incrementando la probabilidad de que el anticuerpo se una solo a su antígeno.

Posteriormente se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación orbital suave con el primer anticuerpo en el tampón de unión más idóneo. Los anticuerpos primarios (Tabla 9) fueron preparados a la concentración adecuada en tampón TBST, leche desnatada al 2% y azida sódica al 0,2%. Finalizada la incubación, la membrana fue lavada tres veces durante 10 minutos con tampón TBST e incubada con los anticuerpos secundarios correspondientes durante una hora en agitación y temperatura ambiente. Se utilizaron dos tipos de anticuerpos secundarios: anti-conejo (para  $\beta$ -actina) o anti-ratón (para Fascina1) los cuales se encuentran conjugados a la enzima peroxidasa de rábano. Los anticuerpos secundarios fueron preparados en tampón TBST y 1% de leche desnatada en polvo a una dilución final 1:5.000. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana fue lavada tres veces con tampón TBST durante diez minutos cada lavado. Los dos primeros lavados se realizaron con tampón TBST, y el último, con TBS sin Tween, ya que se ha observado que el Tween puede interferir en la reacción de revelado.

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>FASCINA1</b>	<b>β-ACTINA</b>
<b>Proveedor de Ac</b>	Dako (Dako, Glostrup, Denmark)	Sigma-Aldrich (S. Louis, MO, USA).
<b>Código</b>	M356701-8	A2066
<b>Dilución</b>	1:500	1:5000

*Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot.*

La detección de proteínas se basó en la reacción quimioluminiscente que desarrolla la enzima peroxidasa de rábano conjugada al anticuerpo secundario. Dicha enzima cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de peróxido de hidrógeno produciéndose quimioluminiscencia. Si se coloca una película fotográfica sobre la membrana, la luz que se desprende en la reacción permite detectar la actividad enzimática de donde se encuentra el anticuerpo. Para revelar la membrana se empleó el kit de quimioluminiscencia ECL Plus (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. La emisión se registró en un ChemiDoc™ XRS+ System (Revelado digital sin película fotográfica). La cuantificación de las bandas se realizó con el programa de imagen ImageJ. Para cuantificar las bandas se seleccionó alrededor de cada banda un área que fue la misma para todas las bandas. El valor de densitometría de cada línea celular se dividió entre el valor del control. Se realizó la media del resultado de los dos geles.

### III.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences for Windows, SPSS versión 21.0 (SPSS® Statistical software, an IBM Company, USA).

Se utilizó el test  $\chi^2$  de Pearson para analizar la asociación entre las distintas variables cualitativas (género, edad, localización, estadio Duke, grado WHO, tipo, etc.) mediante las tablas de contingencia. Se analizaron los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos. Como no seguían una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico de U de Mann Whitney para comparar los valores de ARNm obtenidos por qPCR de los distintos grupos experimentales. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0.05$ . En el caso de las GTPasas también se realizó un análisis de correlación de Spearman. Este tipo de análisis nos permite medir la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias continuas. La interpretación de coeficiente de Spearman oscila entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente, 0 cero, significa no correlación pero no independencia.

Se calculó el área bajo la curva ROC (característica Operativa del Receptor) para evaluar el valor de la inmunohistoquímica y parámetros moleculares como marcadores de diagnóstico del CS. Los parámetros analizados fueron la puntuación de la inmunotinción para Fascina1, Hipocalcina y  $\beta$ -Distroglicano.

Para el análisis estadístico univariante se elaboraron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, y se utilizó el test de log-rank para comparar las distribuciones de

supervivencia y ver la significación estadística. Los pacientes que murieron en el período postoperatorio (<1 mes) fueron excluidos de este análisis. Para el análisis multivariado se utilizó el modelo de regresión de Cox para determinar factores pronósticos independientes en supervivencia postoperatoria, considerando como criterio de inclusión un valor de  $p < 0.05$  y como criterio de exclusión un valor de  $p > 0.10$ , en un procedimiento por pasos hacia delante (stepwise forward). Los parámetros considerados fueron el diagnóstico (CS frente a CC y CS frente CCR hMSI-H), edad, género, localización tumoral (proximal o distal/recto), estadio Dukes (A/B frente C), y patrón de inmunotinción (positivo o negativo) para fascinina1, hipocalcina y  $\beta$ -dístroglicano.





## **IV. RESULTADOS**





## **IV. RESULTADOS**

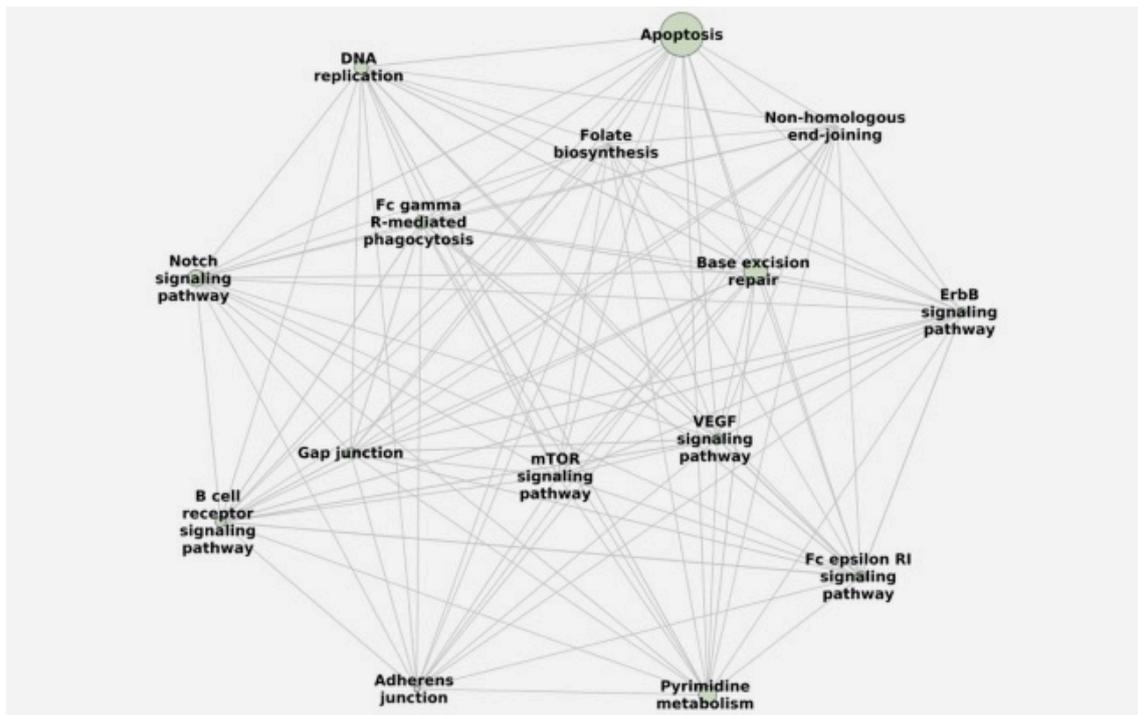
### **IV.1. Estudio comparativo entre CS y CC**

#### **IV. 1. 1. Análisis por microarray**

No se observaron diferencias significativas en cuanto a características demográficas y clinicopatológicas entre las muestras CS y CC utilizadas en el estudio por microarrays.

##### **IV.1.1.1. Funciones diferencialmente expresadas**

Los perfiles de expresión génica de la comparación realizada entre CS (n = 11) y CC (n = 15) revelaron 103 rutas KEGG diferencialmente expresadas. Entre las rutas KEGG de CS (Figura 1) encontramos apoptosis (hsa04210), morfogénesis (ruta de señalización de Notch (hsa04330)), ruta VEGF (hsa04370); organización de citoesqueleto en uniones de membrana (Gap junction (hsa04330), uniones adherentes (hsa04520)); reparación y síntesis de ADN (metabolismo de pirimidinas (hsa00240), replicación del ADN (hsa03030), unión no homóloga de los extremos (hsa03450), reparación por excisión de base (hsa03410), biosíntesis de folato (hsa00790)); respuesta celular B (receptor de la señal celular B (hsa04662), señalización Fc epsilon RI (hsa04662), fagocitosis mediada por Fc gamma R (hsa04666)); señalización del factor de crecimiento (ruta de señalización ErbB (hsa04012), ruta señalización mTOR (hsa04150)) y metabolismo lipídico y proteico, mientras que las funciones sobreexpresadas en CC estaban principalmente asociadas con la respuesta inmune, tanto en el rechazo de xenoinjertos (rechazo aloinjerto (hsa05330), enfermedad injerto contra huésped (hsa05332)) o en enfermedades autoinmunes, enfermedad tiroidea autoinmune (hsa05320), diabetes mellitus tipo I (hsa04940)).



**Figura 1.** Red de rutas KEGG seleccionadas por estar diferencialmente representadas en CS respecto a CC.

En cuanto a Gene Ontology, de la base de datos de procesos biológicos GO, se encontraron 306 términos GO expresados significativamente entre CS y CC. Tras el filtrado, se obtuvieron 19 funciones diferencialmente expresadas en CS. La mayoría de ellas estaban relacionadas con el transporte de vesículas (cuatro), la morfogénesis (tres), los marcadores neuronales (dos), transición epitelio mesénquima (uno), la regulación negativa de la IL-12 (uno), la metilación del ADN (uno), el canal de iones (uno) y la ruta del receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGFR) (uno).

En cuanto a la base de datos GO de función molecular, se observaron 248 términos GO diferencialmente expresados con significación estadística entre CS y CC. Después del proceso de filtrado por percentiles, 21 términos se mantuvieron diferencialmente expresados, los cuales estaban relacionadas en mayor grado con el transporte de vesículas y el canal de iones (seis), GTPasas relacionadas con RAS (dos),

TGFR (uno) y del metabolismo de hidratos de carbono.

Por último, de los 175 términos GO se obtuvieron 85 funciones de componentes celulares al aplicar la filtración. En CS, la mayoría de ellas estaban relacionadas con la membrana (14), formación de vesículas (20), citoesqueleto (14), estructuras neuronales (6) y la ruta del factor de crecimiento (6).

#### IV.1.1.2. Genes diferencialmente expresados

El análisis de los perfiles de expresión de ARNm identificaron quince ARNms diferencialmente expresados, doce de los cuales estaban sobreexpresados y tres reducidos en CS, comparados con CC (Tabla 1). Los genes diferencialmente expresados incluyeron varios dominios dedos de zinc (INSM1, ZDHHC12, ZNF329); citoesqueleto (FSCN1, DAG1); unión a Ca<sup>2+</sup> (HPCA, TTYH3); proteínas de transporte (SLC27A4), así como ARNs no codificante.

Símbolo	Nombre del gen	Función de la proteína	Estadístico	Relación de cambio	P valor bruto	P valor ajustado
A_24_P791862	UniGene Hs.680505		11,031	0,545	1,29E-14	3,84E-10
FSCN1	Fascin actin-bundling protein 1	Proteína de unión a actina. Participa en la migración celular, motilidad, adhesión e interacciones celulares.	6,167	1,530	1,52E-07	0,002
LOC349160	Hypothetical. Similar: 60S ribosomal protein L18		5,986	0,444	2,86E-07	0,003
A_24_P934826	NCRNA00051 nonprotein coding RNA 51		5,883	0,472	4,09E-07	0,003

THC	THC2539939		5,242	2,647	3,72E-06	0,019
DAG1	Dystroglycan 1	Componente de unión a la laminina del complejo de distrofina-glicoproteína.	5,177	0,883	4,64E-06	0,020
HPCA	Hippocalcin	Proteína neuro específica de unión al calcio.	5,085	1,156	6,35E-06	0,024
TTYH3	Tweety family member 3	Calcio activado por el canal de conductancia al Cl	5,041	0,882	7,38E-06	0,024
ACPP	Acid phosphatase, prostate	Cataliza la conversión de monoéster ortofosfórico a alcohol y ortofosfato.	4,986	2,159	8,87E-06	0,024
SLC27A4	Solute carrier family 27	Proteína transportadora de ácidos grasos.	4,985	1,062	8,92E-06	0,024
INSM1	Insulinoma-associated 1	Proteína tanto con dominio de unión al ADN que contiene dedos de zinc, como prohormona	4,918	1,747	1,12E-05	0,028
ZDHHC12	Zinc finger, DHHC-type containing 12	Ión metálico, con actividad transferasa de grupos acilo	4,772	0,879	1,82E-05	0,036
A_24_P324488	SUGT1 SGT1	Supresor G2 del alelo de SKP1	-4,870	-0,611	1,31E-05	0,028
LOC100272228	LOC100272228 Hipotético LOC100272228		-4,886	-0,628	1,24E-05	0,028
ZNF329	Zinc finger protein 329	Proteína de asociación nuclear	-5,186	-1,244	4,51E-06	0,020

**Tabla 1.** Muestra los ARNms diferencialmente expresados entre CS y CC obtenidos de los perfiles moleculares para los que se conoce el nombre del gen.

Basandonos en el cambio diferencial en la expresión de ARNm, la importancia de las funciones biológicas y la disponibilidad de anticuerpos, se decidió validar la Fascina1 (*FSCN1*) a nivel de ARNm y de expresión de proteínas por tener una p

ajustada más alta ( $p = 0.0022$ ), el  $\beta$ -Distroglicano (*DAG1*) con  $p=0.019$  y la Hipocalcina (*HPCA*) con un valor de  $p = 0,0237$ . Además, se seleccionaron genes con función relacionada con GTPasas citoplasmáticas implicadas en reordenación del citoesqueleto por aparecer sobreexpresadas por microarrays en CS tanto como ruta como en procesos GO: *RHOA*, *RHOC*, *RHOV*, *CDC42* y *RAC*. La desregulación de GTPasas parece ser una característica de los CS, por lo que sería interesante comprobar si ésto también se cumple para otros CCRs que son punto final de la ruta serrada como el MSI-H esporádico. Así, se decidió comparar la expresión de GTPasas tanto en CC como en CCR hMSI-H.

#### **IV.1.1.3. Funciones celulares de los genes seleccionados**

##### **Fascina 1**

Localización citogenética: 7p22.1. Fascina1 aparece asociada a la actina y participa en la organización de las dos estructuras básicas en las que participa la actina: en las protusiones de las células corticales que median en las interacciones celulares y en la migración, y en las redes de microfilamentos citoplasmáticos que contribuyen a la arquitectura celular y a los movimientos intracelulares (**Adams JC, 2004**).

##### **Hipocalcina**

Localización citogenética: 1p35. La proteína que codifica este gen es un miembro de la familia de proteínas de unión al calcio descritas en neuronas, que se encuentra en el cerebro y la retina. Esta proteína está asociada con la membrana plasmática. Tiene similitudes con proteínas localizadas en las células fotorreceptoras que regulan la transducción de fotoseñal de una manera sensible al calcio. Muestra actividad recoverina, que es una proteína neuronal enlazadora de calcio, y una inhibición

dependiente de calcio por la rodopsina quinasa. Se cree que desempeña un papel importante en las neuronas del sistema nervioso central en un número de especies. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3208>). Ya que la actividad antiapoptótica de la hipocalcina parece ser ejercida a través de su interacción con NAIP (**Mercer EA et al, 2000**), se decidió estudiar su expresión por inmunohistoquímica en las muestras colorrectales. NAIP es miembro de una familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis. Se ha implicado en la respuesta adaptativa de las células neuronales a la lesión hipóxico-isquémica (**Berthelet J and Dubrez L, 2013**).

### **Distroglicano1**

Localización citogenética: 3p21. El Distroglicano es una proteína transmembrana que comprende una subunidad extracelular A y subunidad transmembrana B que unen el citoesqueleto a la matriz extracelular mediante la unión a laminina y otras moléculas de la matriz (**Ervasti JM et al, 1993; Winder SJ, 2001**).

### **GTPasas**

La señalización de *RHOA* (localización citogenética: 3p21.31) juega un papel crítico en muchos procesos celulares, incluyendo la migración celular. Participa en la remodelación del citoesqueleto de actina durante la morfogénesis celular y la motilidad. Durante la citocinesis, *RHOA* organiza el conjunto de anillo de contracción y constricción donde la señalización está controlada por el huso cromático (**Maesaki R et al, 1999**) *RHOA* tiene dos homólogos altamente relacionados: *RHOB* y *RHOC* (localización citogenética: 1p13.2). El examen de las estructuras de los genes que codifican estas proteínas sugiere que *RHOC* surgió de la duplicación del gen de *RHOA* (**Ridley AJ, 2003**).

*RHOV* (localización citogenética: 15q13.3) también conocida como Chp (Cdc42 homologous protein) induce la formación de lamelipodios, se localiza en adhesiones focales en las células endoteliales y activa la proteína quinasa JNK. Varios efectores de RHOV han sido identificados como quinasas activadas por p21 (**Shepelev MV, et al. 2013**).

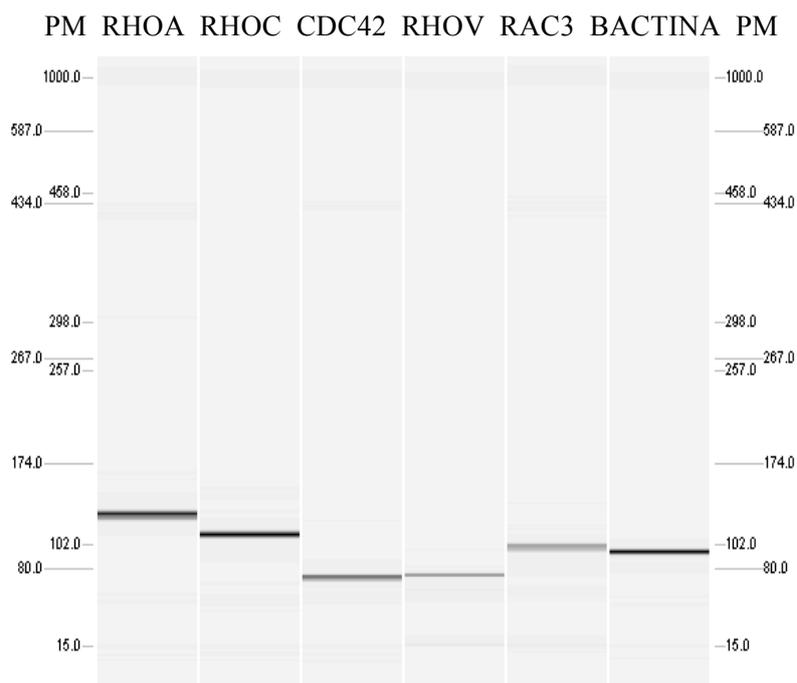
El gen *CDC42* (localización citogenética: 1p36.12) codifica esta pequeña GTPasa que regula las vías de señalización que controlan diversas funciones celulares que incluyen la morfología celular, la migración, la endocitosis y la progresión del ciclo celular. (**Clark EA et al, 2000**). Esta proteína podría regular la polimerización de actina a través de su unión directa a la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich Neural (N-WASP), que posteriormente se activa el complejo Arp2 / 3 (**Lei Gao et al, 2013**).

*RAC3* (localización citogenética: 17q25.3) reorganiza la actina para producir láminas de membrana o lamelipodios (**Gest C et al, 2013**).

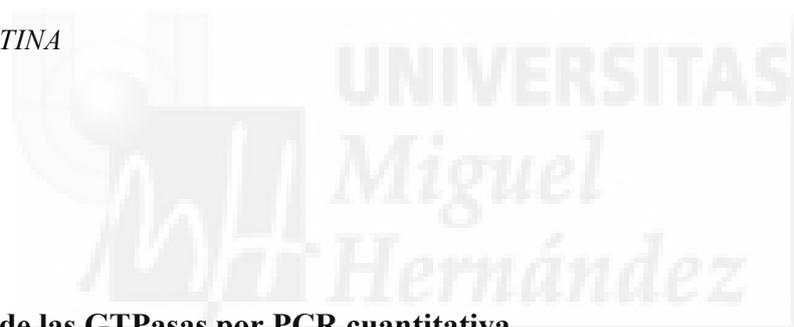
#### **IV.1.2. Expresión por PCR cuantitativa**

##### **IV.1.2.1. Caracterización de la expresión de GTPasas**

Para comprobar que la amplificación mediante PCR cuantitativa procedía exclusivamente del ARNm se realizó una electroforesis de los productos amplificados. La figura 2 muestra una electroforesis de los productos amplificados. Todos los cebadores amplificaron un solo producto cuyo tamaño coincidió con el esperado según la secuencia del ARNm.



**Figura 2** . Electroforesis de los productos de la qPCR para RHOA, RHOC, CDC42, RHOV, RAC3, y  $\beta$ ACTINA



## Resultados de las GTPasas por PCR cuantitativa

### Comparaciones CS con CC

No se observaron diferencias significativas en cuanto a las características demográficas y clinicopatológicas para las muestras utilizadas por qPCR entre CS y CC.

Si comparamos entre muestras tumorales CC y CS (Tabla 2) obtenemos una mayor expresión de *CDC42* en CC y una mayor expresión de *RAC3* en CS. Para el resto de genes no se observan diferencias significativas.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	P
RHOA	CCt	0,1938 $\pm$ 0,2763	0,0866	0,1088	13	0,935
	CSt	0,3197 $\pm$ 0,8645	0,0687	0,1378	15	
RHOA	CCt	0,0515 $\pm$ 0,0610	0,0288	0,0418	13	0,358
	CSt	0,0565 $\pm$ 0,0708	0,0358	0,0395	15	
CDC42	CCt	0,2427 $\pm$ 0,2572	0,1129	0,3400	13	<0,0001
	CSt	0,0036 $\pm$ 0,0106	0,0006	0,0010	15	
RHOV	CCt	0,0014 $\pm$ 0,0019	0,0010	0,0014	13	0,961
	CSt	0,0021 $\pm$ 0,0028	0,0006	0,0022	15	
RAC3	CCt	0,0032 $\pm$ 0,0042	0,0008	0,0073	13	<0,0001
	CSt	0,1405 $\pm$ 0,2112	0,0759	0,0688	15	

**Tabla 2.** Resultados qPCR al comparar muestras CC tumorales (CCt) y CS tumorales (CSt). La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

Para ver si la expresión de las GTPasas variaba en muestras de tejido normal adyacente al tumor y muestras de tejido tumoral se comparó la expresión entre los distintos grupos.

Cuando comparamos todas las muestras (CC y CS) normales con las tumorales (Tabla 3) la expresión es mayor para *RHOA*, *RHOC* y *CDC42* en tejido normal y para *RAC3* y *RHOV* en tumoral.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	P
RHOA	CCt y CSt	0,2613 $\pm$ 0,6524	0,0738	0,1183	28	<0,0001
	CCn y CSn	0,4959 $\pm$ 0,3755	0,4027	0,6047	22	
RHOC	CCt y CSt	0,0542 $\pm$ 0,0653	0,0298	0,0390	28	<0,0001
	CCn y CSn	0,3323 $\pm$ 0,3968	0,1415	0,5148	22	
CDC42	CCt y CSt	0,1146 $\pm$ 0,2103	0,0226	0,1083	28	<0,0001
	CCn y CSn	0,5461 $\pm$ 0,4950	0,3485	0,8236	22	
RHOV	CCt y CSt	0,0018 $\pm$ 0,0024	0,0008	0,0017	28	0,042
	CCn y CSn	0,0009 $\pm$ 0,0012	0,0003	0,0010	22	
RAC3	CCt y CSt	0,0768 $\pm$ 0,1673	0,0206	0,0764	28	<0,0001
	CCn y CSn	0,0013 0,0015	0,0010	0,0014	22	

**Tabla 3.** Resultados qPCR para comparar muestras tumorales (CC y CS) con normales (CC y CS). La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

En la comparación entre muestras CC normales con tumorales (Tabla 4) se observa mayor expresión significativamente mayor para *RHOA*, *RHOC* y *CDC42* en tejido normal.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	P
RHOA	CCt	0,1938 $\pm$ 0,2763	0,0866	0,1088	13	<0,0001
	CCn	0,5686 $\pm$ 0,3845	0,5634	0,7251	15	
RHOC	CCt	0,0515 $\pm$ 0,0610	0,0288	0,0418	13	0,001
	CCn	0,3987 $\pm$ 0,4530	0,1466	0,5919	15	
CDC42	CCt	0,2427 $\pm$ 0,2572	0,1129	0,3400	13	0,003
	CCn	0,5996 $\pm$ 0,5428	0,4415	0,8860	15	
RHOV	CCt	0,0014 $\pm$ 0,0019	0,0010	0,0014	13	0,110
	CCn	6,55E-4 $\pm$ 5,92E-4	0,0004	0,0009	15	
RAC3	CCt	0,0032 $\pm$ 0,0042	0,0008	0,0073	13	0,626
	CCn	0,0014 $\pm$ 0,0017	0,0008	0,0016	15	

**Tabla 4.** Resultados qPCR al comparar muestras CC tumorales y CC normales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

Los resultados de la comparación entre muestras CS normales con tumorales (Tabla 5) muestran, como en la comparación anterior, expresión mayor y estadísticamente significativa para *RHOA*, *RHOC* y *CDC42* en tejido CS normal. Sin embargo, para *RAC3* se observa una mayor expresión en el tejido tumoral ( $p < 0,0001$ ).

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	P
RHOA	CSn	0,3402 $\pm$ 0,3271	0,2690	0,5234	7	0,021
	CSt	0,3197 $\pm$ 0,8645	0,0687	0,1378	15	
RHOC	CSn	0,1903 $\pm$ 0,1942	0,0850	0,3128	7	0,003
	CSt	0,0565 $\pm$ 0,0708	0,0358	0,0395	15	
CDC42	CSn	0,4314 $\pm$ 0,3845	0,3238	0,4918	7	<0,0001
	CSt	0,0036 $\pm$ 0,0106	0,0006	0,0010	15	
RHOV	CSn	0,0013 $\pm$ 0,0019	0,0002	0,0016	7	0,145
	CSt	0,0021 $\pm$ 0,0028	0,0006	0,0022	15	
RAC3	CSn	0,0012 $\pm$ 0,0010	0,0015	0,0013	7	<0,0001
	CSt	0,1405 $\pm$ 0,2112	0,0759	0,0688	15	

**Tabla 5.** Resultados qPCR al comparar muestras CS normales y CS tumorales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

En la comparación entre muestras normales de casos CS frente a CC (Tabla 6) no observamos diferencias en las expresión en los genes estudiados.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	P
RHOA	CSn	0,3402 $\pm$ 0,3271	0,2690	0,5234	7	0,178
	CCn	0,5686 $\pm$ 0,3845	0,5634	0,7251	15	
RHOA	CSn	0,1903 $\pm$ 0,1942	0,0850	0,3128	7	0,342
	CCn	0,3987 $\pm$ 0,4530	0,1466	0,5919	15	
CDC42	CSn	0,4314 $\pm$ 0,3845	0,3238	0,4918	7	0,329
	CSn	0,0036 $\pm$ 0,0106	0,0006	0,0010	15	
RHOV	CSn	0,0013 $\pm$ 0,0019	0,0002	0,0016	7	1,000
	CCn	6,55E-4 $\pm$ 5,92E-4	0,0004	0,0009	15	
RAC3	CSn	0,0012 $\pm$ 0,0010	0,0015	0,0013	7	1,000
	CCn	0,0014 $\pm$ 0,0017	0,0008	0,0016	15	

**Tabla 6.** Resultados qPCR al comparar muestras CS normales y CC normales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

### **Comparaciones CS con hMSI-H**

Para ver si estos marcadores son también efectivos para comparar CS con CCR hMSI-H, que son puntos finales de la ruta serrada, se realizó la qPCR. Las muestras utilizadas estaban emparejadas excepto por localización.

Para la comparación entre muestras tumorales CCR hMSI-H con CC (Tabla 7), para *RHOA* y *RAC3* se observa mayor expresión en CCR hMSI-H y para *CDC42* en CC.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	P
RHOA	hMSI-Ht	1,3214 $\pm$ 1,0981	1,3226	1,8507	7	<0,0001
	CCt	0,1938 $\pm$ 0,2763	0,0866	0,1088	13	
RHOC	hMSI-Ht	0,0787 $\pm$ 0,0553	0,0661	0,0699	7	0,069
	CCt	0,0515 $\pm$ 0,0610	0,0288	0,0418	13	
CDC42	hMSI-Ht	0,0007 $\pm$ 0,0004	0,0007	0,0006	7	<0,0001
	CCt	0,2427 $\pm$ 0,2572	0,1129	0,3400	13	
RHOV	hMSI-Ht	0,0016 $\pm$ 0,0010	0,0016	0,0018	7	0,383
	CCt	0,0014 $\pm$ 0,0019	0,0010	0,0014	13	
RAC3	hMSI-Ht	1,2060 $\pm$ 0,9740	1,1036	1,7273	7	<0,0001
	CCt	0,0032 $\pm$ 0,0042	0,0008	0,0073	13	

**Tabla 7.** Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H tumorales y CC tumorales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

Al comparar muestras tumorales CCR hMSI-H con CS (Tabla 8) obtenemos mayor expresión de *RHOA*, *RHOC* y *RAC3* en los casos CCR hMSI-H.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	N	P
RHOA	hMSI-Ht	1,3214 $\pm$ 1,0981	1,3226	1,8507	7	<0,0001
	CSt	0,3197 $\pm$ 0,8645	0,0687	0,1378	15	
RHOC	hMSI-Ht	0,0787 $\pm$ 0,0553	0,0661	0,0699	7	0,031
	CSt	0,0565 $\pm$ 0,0708	0,0358	0,0395	15	
CDC42	hMSI-Ht	0,0007 $\pm$ 0,0004	0,0007	0,0006	7	1,000
	CSt	0,0036 $\pm$ 0,0106	0,0006	0,0010	15	
RHOV	hMSI-Ht	0,0016 $\pm$ 0,0010	0,0016	0,0018	7	0,458
	CSt	0,0021 $\pm$ 0,0028	0,0006	0,0022	15	
RAC3	hMSI-Ht	1,2060 $\pm$ 0,9740	1,1036	1,7273	7	0,009
	CSt	0,1405 $\pm$ 0,2112	0,0759	0,0688	15	

**Tabla 8.** Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H tumorales y CS tumorales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

## Correlaciones

Como este grupo de GTPasas se asocian entre sí al realizar funciones relacionadas se decidió investigar si existía correlación entre ellas. Primeramente se incluyeron todas las muestras del estudio y, como se muestra en la tabla 9, se observó una correlación moderada entre *CDC42* y *RAC3* y entre *RHOA* con *CDC42*, mientras que para *RHOA* con *RHOC* la correlación fue baja.

			RHOA	RHOC	CDC42	RHOV	RAC3
<b>RHO</b>	RHOA	Coef. correlación	1,000	,488**	,564**	-0,040	-0,145
		Sig. (2 tailed)	.	0,000	0,000	0,770	0,273
		N	63	63	58	56	59
<b>RHOE</b>	RHOC	Coef. correlación	,488**	1	,319*	0,008	-0,078
		Sig. (2 tailed)	0,000	.	0,015	0,955	0,556
		N	63	65	58	57	60
<b>RHOE</b>	CDC42	Coef. correlación	,564**	,319*	1	-0,050	-,581**
		Sig. (2 tailed)	0,000	0,015	.	0,730	0,000
		N	58	58	58	51	54
<b>RHOE</b>	RHOV	Coef. correlación	-0,040	0,008	-0,050	1,000	,295*
		Sig. (2 tailed)	0,770	0,955	0,730	.	0,027
		N	56	57	51	58	56
<b>RHOE</b>	RAC3	Coef. correlación	-0,145	-0,078	-,581**	,295*	1,000
		Sig. (2 tailed)	0,273	0,556	0,000	0,027	.
		N	59	60	54	56	60

**Tabla 9.** Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian todos los casos (CSn, CSt, CCn, CCt, hMSI-Ht).

Con la finalidad de investigar si estas correlaciones son específicas de tipo tumoral se estudiaron por grupos de tejido. La siguiente tabla (Tabla 10) muestra las correlaciones al estudiar todos los tejidos tumorales juntos. Hay una correlación baja de *RHOA* con *RHOC* y moderada para *RHOA* con *RAC3* y *RAC3* con *CDC42*.

			<b>RHOA</b>	<b>RHOC</b>	<b>CDC42</b>	<b>RHOV</b>	<b>RAC3</b>
<b>RHO</b>	<b>RHOA</b>	Coef. correlación	1,000	,314*	-0,109	0,018	,556**
		Sig. (2 tailed)	.	0,036	0,499	0,912	0,000
		N	45	45	41	40	41
<b>RHOE</b>	<b>RHOC</b>	Coef. correlación	,314*	1,000	-0,026	0,051	0,224
		Sig. (2 tailed)	0,036	.	0,870	0,749	0,154
		N	45	47	41	41	42
<b>RHOE</b>	<b>CDC42</b>	Coef. correlación	-0,109	-0,026	1,000	0,048	-,674**
		Sig. (2 tailed)	0,499	0,870	.	0,777	0,000
		N	41	41	41	37	37
<b>RHOE</b>	<b>RHOV</b>	Coef. correlación	0,018	0,051	0,048	1,000	0,105
		Sig. (2 tailed)	0,912	0,749	0,777	.	0,518
		N	40	41	37	42	40
<b>RHOE</b>	<b>RAC3</b>	Coef. correlación	,556**	0,224	-,674**	0,105	1,000
		Sig. (2 tailed)	0,000	0,154	0,000	0,518	.
		N	41	42	37	40	42

**Tabla 10.** Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian todas las muestras tumorales (CC, CS y hMSI-H).

Para las muestras CC tumorales solo observamos que hay una correlación moderada de *RHOA* con *CDC42* (Tabla 11).

			<b>RHOA</b>	<b>RHOC</b>	<b>CDC42</b>	<b>RHOV</b>	<b>RAC3</b>
<b>RHO</b>	RHOA	Coef. correlación	1,000	-0,218	,539*	0,118	0,152
		Sig. (2 tailed)	.	0,400	0,026	0,676	0,605
		N	17	17	17	15	14
<b>RHOE</b>	RHOC	Coef. correlación	-0,218	1,000	0,14	0,038	0,154
		Sig. (2 tailed)	0,400	.	0,593	0,888	0,585
		N	17	19	17	16	15
<b>RHOE S P</b>	CDC42	Coef. correlación	,539*	0,14	1,000	0,325	0,305
		Sig. (2 tailed)	0,026	0,593	.	0,237	0,288
		N	17	17	17	15	14
<b>RHOE A R</b>	RHOV	Coef. correlación	0,118	0,038	0,325	1,000	0,375
		Sig. (2 tailed)	0,676	0,888	0,237	.	0,168
		N	15	16	15	17	15
<b>RHOE A R M</b>	RAC3	Coef. correlación	0,152	0,154	0,305	0,375	1,000
		Sig. (2 tailed)	0,605	0,585	0,288	0,168	.
		N	14	15	14	15	15

**Tabla 11.** Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las muestras CC tumorales.

Al estudiar la correlación en muestras CS tumorales (Tabla 12) observamos una alta correlación entre *RHOA* y *RAC3*.

			RHOA	RHOC	CDC42	RHOV	RAC3
<b>RHO</b>	RHOA	Coef. correlación	1,000	0,313	-0,004	-0,191	,756**
		Sig. (2 tailed)	.	0,206	0,990	0,448	0,000
		N	18	18	15	18	18
<b>RHO</b>	RHOC	Coef. correlación	0,313	1,000	0,143	-0,005	0,168
		Sig. (2 tailed)	0,206	.	0,612	0,984	0,505
		N	18	18	15	18	18
<b>RHO</b>	CDC42	Coef. correlación	-0,004	0,143	1,000	0,471	-0,375
		Sig. (2 tailed)	0,990	0,612	.	0,076	0,168
		N	15	15	15	15	15
<b>RHO</b>	RHOV	Coef. correlación	-0,191	-0,005	0,471	1,000	-0,424
		Sig. (2 tailed)	0,448	0,984	0,076	.	0,079
		N	18	18	15	18	18
<b>RAC</b>	RAC3	Coef. correlación	,756**	0,168	-0,375	-0,424	1,000
		Sig. (2 tailed)	0,000	0,505	0,168	0,079	.
		N	18	18	15	18	18

**Tabla 12.** Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las muestras CS tumorales.

Para las muestras CCR hMSI-H (Tabla 13) obtenemos una alta correlación entre *RHOA* y *RAC3* y entre *CDC42* y *RAC3*.

			RHOA	RHOC	CDC42	RHOV	RAC3
<b>RHOA</b>	Coef. correlación		1,000	0,354	0,067	0,179	,800**
	Sig. (2 tailed)		.	0,316	0,865	0,702	0,010
	N		10	10	9	7	9
<b>RHOC</b>	Coef. correlación		0,354	1,000	0,083	0,107	0,033
	Sig. (2 tailed)		0,316	.	0,831	0,819	0,932
	N		10	10	9	7	9
<b>CDC42</b>	Coef. correlación		0,067	0,083	1,000	0,107	,810*
	Sig. (2 tailed)		0,865	0,831	.	0,819	0,015
	N		9	9	9	7	8
<b>RHOV</b>	Coef. correlación		0,179	0,107	0,107	1,000	0,393
	Sig. (2 tailed)		0,702	0,819	0,819	.	0,383
	N		7	7	7	7	7
<b>RAC3</b>	Coef. correlación		,800**	0,033	,810*	0,393	1,000
	Sig. (2 tailed)		0,010	0,932	0,015	0,383	.
	N		9	9	8	7	9

**Tabla 13.** Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las muestras hMSI-H tumorales.

Al investigar en todas las muestras normales que disponemos (CS y CC) (Tabla 14) obtenemos una correlación moderada para *RHOA* con *CDC42* y *RHOV* y baja para *RHOA* con *RHOC*. También se observa correlación moderada para *RHOC* con *RAC3* y baja para *RHOC* con *RHOV*.

			<b>RHOA</b>	<b>RHOC</b>	<b>CDC42</b>	<b>RHOV</b>	<b>RAC3</b>
<b>RHO</b>	<b>RHOA</b>	Coef. correlación	1,000	,421*	,578**	,637**	0,266
		Sig. (2 tailed)	.	0,029	0,002	0,001	0,181
		N	27	27	25	24	27
<b>RHOE</b>	<b>RHOC</b>	Coef. correlación	0,421*	1,000	-0,098	0,410*	,623**
		Sig. (2 tailed)	0,029	.	0,642	0,047	0,001
		N	27	27	25	24	27
<b>RHOESP</b>	<b>CDC42</b>	Coef. correlación	,578**	-0,098	1,000	0,308	-0,021
		Sig. (2 tailed)	0,002	0,642	.	0,164	0,922
		N	25	25	25	22	25
<b>RHOEAR</b>	<b>RHOV</b>	Coef. correlación	,637**	,410*	0,308	1,000	0,344
		Sig. (2 tailed)	0,001	0,047	0,164	.	0,099
		N	24	24	22	24	24
<b>RHOEMAN</b>	<b>RAC3</b>	Coef. correlación	0,266	,623**	-0,021	0,344	1,000
		Sig. (2 tailed)	0,181	0,001	0,922	0,099	.
		N	27	27	25	24	27

**Tabla 14.** Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las todas las muestras normales (CC y CS).

El análisis de las muestras CC normales (Tabla 15) por separado nos indica que se mantiene la correlación moderada de *RHOA* con *CDC42* y *RHOV*, y *RHOC* con *RAC3*.

			RHOA	RHOC	CDC42	RHOV	RAC3
<b>RHOA</b>	Coef. correlación		1,000	0,253	,662**	,550*	0,194
	Sig. (2 tailed)		.	0,345	0,005	0,034	0,471
	N		16	16	16	15	16
<b>RHOC</b>	Coef. correlación		0,253	1,000	-0,224	0,411	,685**
	Sig. (2 tailed)		0,345	.	0,405	0,128	0,003
	N		16	16	16	15	16
<b>CDC42</b>	Coef. correlación		,662**	-0,224	1,000	0,436	-0,206
	Sig. (2 tailed)		0,005	0,405	.	0,104	0,444
	N		16	16	16	15	16
<b>RHOV</b>	Coef. correlación		,550*	0,411	0,436	1,000	0,286
	Sig. (2 tailed)		0,034	0,128	0,104	.	0,302
	N		15	15	15	15	15
<b>RAC3</b>	Coef. correlación		0,194	,685**	-0,206	0,286	1,000
	Sig. (2 tailed)		0,471	0,003	0,444	0,302	.
	N		16	16	16	15	16

**Tabla 15.** Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las todas las muestras CC normales.

Para las muestras CS normales (Tabla 16) se observa correlación alta de *RHOA* con *RHOV* y moderada de *RHOA* con *RHOC*.

			RHOA	RHOC	CDC42	RHOV	RAC3
<b>RHO</b>	RHOA	Coef. correlación	1,000	,609*	0,117	,717*	0,182
		Sig. (2 tailed)	.	0,047	0,765	0,030	0,593
		N	11	11	9	9	11
<b>DHE</b>	RHOC	Coef. correlación	,609*	1,000	0,150	0,517	0,345
		Sig. (2 tailed)	0,047	.	0,700	0,154	0,298
		N	11	11	9	9	11
<b>SDPE</b>	CDC42	Coef. correlación	0,117	0,15	1,000	0,107	0,483
		Sig. (2 tailed)	0,765	0,700	.	0,819	0,187
		N	9	9	9	7	9
<b>EAR</b>	RHOV	Coef. correlación	,717*	0,517	0,107	1,000	0,483
		Sig. (2 tailed)	0,030	0,154	0,819	.	0,187
		N	9	9	7	9	9
<b>MA</b>	RAC3	Coef. correlación	0,182	0,345	0,483	0,483	1,000
		Sig. (2 tailed)	0,593	0,298	0,187	0,187	.
		N	11	11	9	9	11

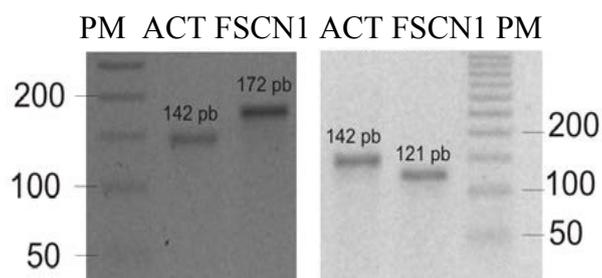
**Tabla 16.** Correlaciones. La tabla muestra el coeficiente de correlación, la prueba de significancia de dos colas (Sig. 2 tailed) y el número de muestras (N), cuando se estudian las todas las muestras CS normales.

#### IV.1.2.2. Caracterización de la expresión de Fascina1, Hipocalcina y $\beta$ -Distroglicano

No se observaron diferencias significativas en cuanto a las características demográficas y clinicopatológicas para las muestras utilizadas para el análisis por qPCR entre CS y CC.

Se realizó una electroforesis de los productos amplificados mediante PCR para asegurar que el producto amplificado procedía exclusivamente del ARNm.

Para Fascina1 se seleccionaron dos parejas de cebadores, una de ellas con un cebador en una zona de unión entre dos exones, lo que aseguraba que el producto amplificado procedía exclusivamente del ARNm. La figura 3 y 4 muestran una electroforesis de los productos amplificados. Todos los cebadores amplificaron un solo producto cuyo tamaño coincidió con el esperado según la secuencia del ARNm.



**Figura 3.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de la qPCR de FSCN1 y  $\beta$ -actina. En el gel de la izquierda se muestra el amplicón de FSCN1 que se obtiene con los cebadores 129F y 130R y en el de la derecha el obtenido con los 115F y 116R.

PM HPCA DAG1



**Figura 4.** Electroforesis de los productos de la qPCR de HPCA y DAG1.

Los resultados de la comparación para muestras CC tumoral con CS tumoral (Tabla 17) mostraron mayor expresión a nivel de ARNm en muestras CS, acorde con los datos obtenidos de la expresión génica por microarrays. Los resultados fueron significativos para *HPCA* ( $p = 0,018$ ) y *FSCN1* ( $p = 0,022$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas para *DAG* ( $p = 0,917$ ).

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Interc	n	p
HPCA	CCt	0,0000025 $\pm$ 0,0000023	0,0000018	0,0000037	17	
	CSt	0,0000047 $\pm$ 0,0000030	0,0000040	0,0000059	17	0,018
DAG	CCt	0,01384 $\pm$ 0,00689	0,01323	0,00932	20	
	CSt	0,01497 $\pm$ 0,00954	0,01274	0,01173	21	0,917
FSCN1	CCt	0,00456 $\pm$ ,00646	0,00247	0,00242	18	
	CSt	0,00715 $\pm$ 0,00554	0,00546	0,00937	19	0,022

**Tabla 17.** Resultados qPCR al comparar muestras CC tumorales y CS tumorales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

Con el fin de investigar si los marcadores seleccionados pudieran tener algún papel en el desarrollo tumoral en general se decidieron estudiar las comparaciones entre todas las muestras de tejido sano adyacente al tumor y las tumorales.

De comparación entre todas las muestras tumorales (CCt y CSt) con las de tejido sano (CCn y CSn) (Tabla 18) se observó mayor expresión de *DAG* y *FSCN1* en tejido tumoral teniendo estos resultados significación estadística; *DAG* ( $p = <0,0001$ ), *FSCN1* ( $p = <0,0001$ ).

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Interc	n	p
HPCA	CCt y CSt	0,0000036 $\pm$ 0,0000029	0,0000025	0,0000047	34	
	CCn y CSn	0,0000041 $\pm$ 0,0000053	0,0000027	0,0000029	9	0,918
DAG	CCt y CSt	0,01442 $\pm$ 0,00827	0,01311	0,00945	41	
	CCn y CSn	0,00120 $\pm$ 0,00133	0,00077	0,00077	10	<0,0001
FSCN1	CCt y CSt	0,00589 $\pm$ 0,00607	0,00306	0,00557	37	
	CCn y CSn	0,00139 $\pm$ 0,00069	0,00147	0,00112	12	<0,0001

**Tabla 18.** Resultados qPCR al comparar muestras CC y CS tumorales con CC y CS normales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

Al comparar la expresión de ARNm para los genes *FSCN1*, *HPCA* y *DAG* entre muestras CC normales y CC tumorales (Tabla 19) se obtienen diferencias significativas para *DAG* ( $p = <0,0001$ ) y para *FSCN1* ( $p = 0,018$ ).

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Interc	n	p
HPCA	CCn	0,0000026 $\pm$ 0,0000018	0,0000026	0,0000033	4	
	CCt	0,0000025 $\pm$ 0,0000023	0,0000018	0,0000037	17	0,698
DAG	CCn	0,00080 $\pm$ 0,00048	0,00065	0,00076	5	
	CCt	0,01384 $\pm$ 0,00689	0,01323	0,00932	20	<0,0001
FSCN1	CCn	0,00123 $\pm$ 0,00079	0,00126	0,00121	6	
	CCt	0,00456 $\pm$ ,00646	0,00247	0,00242	18	0,018

**Tabla 19.** Resultados qPCR al comparar muestras CC normales y CC tumorales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

Los resultados de la comparación entre muestras de tejido normal CC y CS se muestran en la tabla 20. No se encontraron diferencias significativas para los genes estudiados en tejido normal.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Interc	n	p
HPCA	CCn	0,0000026 $\pm$ 0,0000018	0,0000026	0,0000033	4	
	CSn	0,0000053 $\pm$ 0,0000070	0,0000027	0,0000094	5	1,000
DAG	CCn	0,00080 $\pm$ 0,00048	0,00065	0,00076	5	
	CSn	0,00161 $\pm$ 0,00184	0,00078	0,00240	5	0,548
FSCN1	CCn	0,00123 $\pm$ 0,00079	0,00126	0,00121	6	
	CSn	0,00155 $\pm$ 0,00059	0,00157	0,00102	6	0,589

**Tabla 20.** Resultados qPCR al comparar muestras CC normales y CS normales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

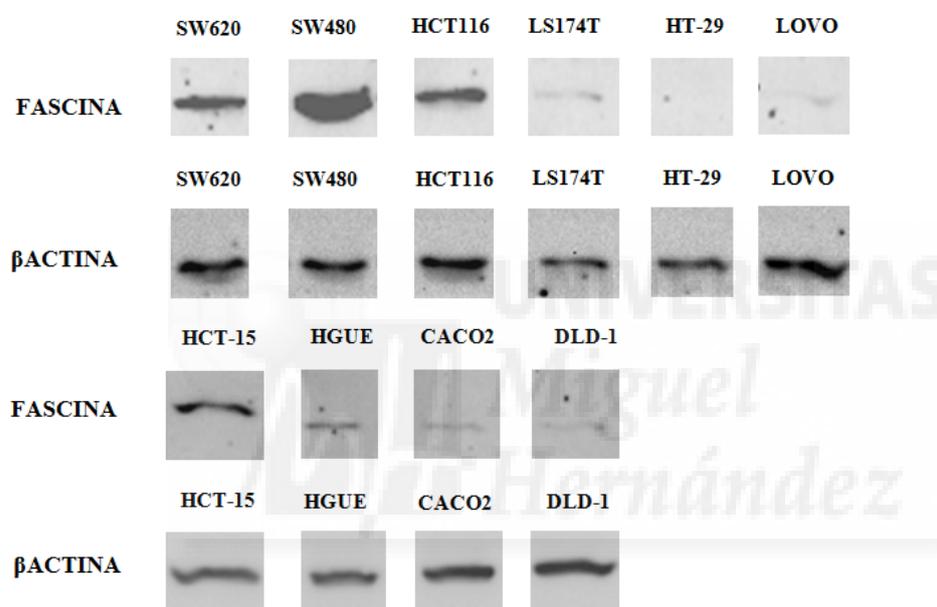
De la comparación entre muestras de tejido CS normal con CS tumoral (Tabla 21) se obtuvieron diferencias significativas para los genes *DAG* ( $p = <0,0001$ ) y *FSCN1* ( $p = <0,0001$ ).

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Interc	n	p
HPCA	CSn	0,0000053 $\pm$ 0,0000070	0,0000027	0,0000094	5	
	CSt	0,0000047 $\pm$ 0,0000030	0,0000040	0,0000059	17	0,543
DAG	CSn	0,00161 $\pm$ 0,00184	0,00078	0,00240	5	
	CSt	0,01497 $\pm$ 0,00954	0,01274	0,01173	21	<0,0001
FSCN1	CSn	0,00155 $\pm$ 0,00059	0,00157	0,00102	6	
	CSt	0,00715 $\pm$ 0,00554	0,00546	0,00937	19	<0,0001

**Tabla 21.** Resultados qPCR al comparar muestras CS normales y CS tumorales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

#### IV.1.3. Expresión de Fascina1 en líneas celulares

Dado el importante papel que parece tener la Fascina1 en el CS y en el desarrollo del CCR en general se decidió caracterizar la expresión de esta proteína por Western Blot en distintas líneas celulares de cáncer colorrectal para poder plantear posibles estudios futuros sobre el efecto funcional de la inhibición o expresión de fascina. Las líneas celulares empleadas fueron las siguientes: HCT-15, SW620, SW480, LS174T, HT-29, LoVo, HCT116, HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1.



**Figura 5.** Expresión de Fascina1 y  $\beta$ -actina en las líneas celulares SW620, SW480, HCT116, LS174T, HT-29, LoVo, HCT-15, , HGUE-C-1, CACO2 y DLD-1.

Se observó diferente expresión de Fascina1. Las líneas celulares con mayor expresión de Fascina1 fueron HCT116, SW480, HCT-15, HGUE-C-1, SW620, y las que menor expresión mostraron fueron LS174T, CACO-2, LoVo y DLD-1

Línea Celular	Densitometría
SW620	0,399
SW480	1,283
HCT116	1,520
LS174T	0,196
LoVo	0,105
HCT-15	0,807
HGUE-C-1	0,456
CACO2	0,122
DLD-1	0,048

**Tabla 22.** Expresión de Fascina1 en líneas celulares. La tabla muestra el valor de la densitometría para cada línea celular obtenido. Los valores de densitometría fueron obtenidos tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

#### IV.1.4. Análisis de la expresión por inmunohistoquímica

Las muestras utilizadas en inmunohistoquímica (CS y CC) estaban emparejadas en cuanto a las características demográficas y clinicopatológicas.

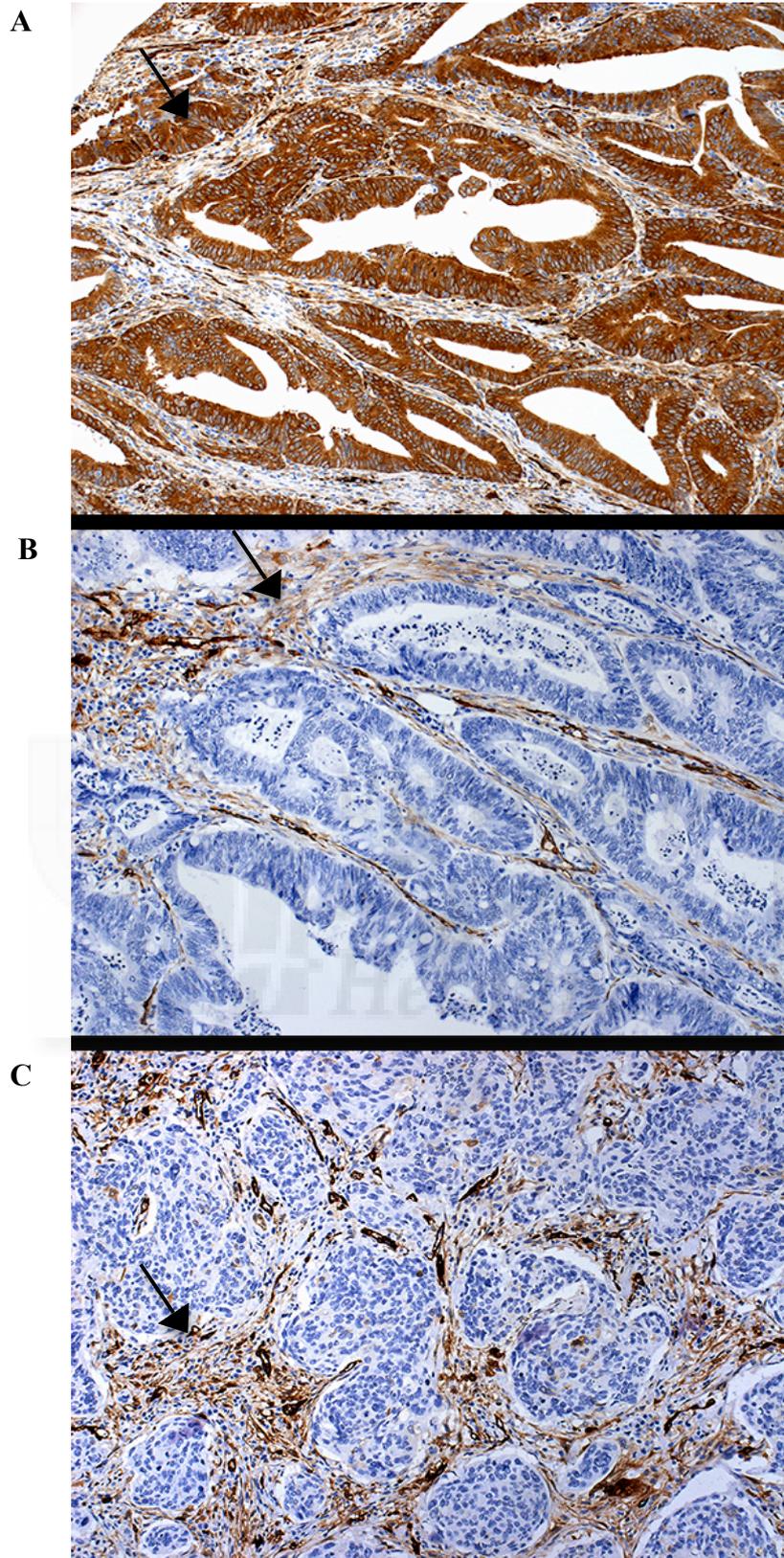
La expresión positiva de Fascina1 fue citoplasmática difusa (Figura 6) y citoplasmática granular en el borde luminal para hipocalcina (Figura 7) y NAIP (Figura 8). La expresión inmunohistoquímica de Fascina1 fue más frecuente en las muestras CS (88.6%) que en las de CCR hMSI-H (50%) con un valor de  $p = 0.0001$ . Para Hipocalcina también se obtuvieron resultados similares, ya que la expresión en muestras CS fue mayor (88.6%) que para los casos CCR hMSI-H (40%) con un valor de  $p < 0.0001$ , confirmando para Fascina1 e Hipocalcina los resultados del array. Por el

contrario, la expresión observada para  $\beta$ -Distroglicano fue igual en ambos tipos de tumores ( $p > 0.05$ ) (Tabla 23).

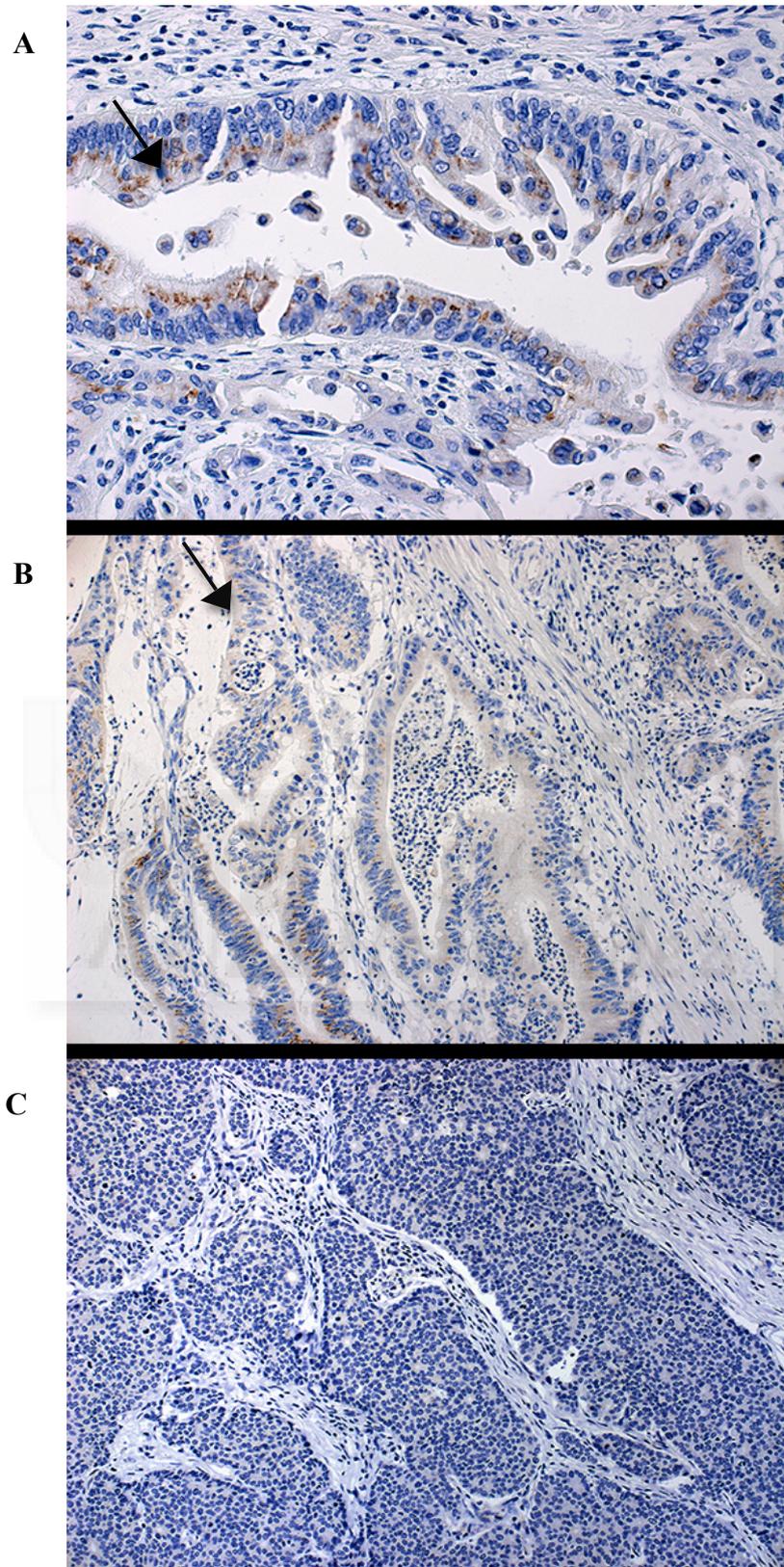
	n	CS, n (%)	CC, n (%)	CCR hMSI-H, n (%)
		70	70	20
Fascina1	Positivo	62 (88.6)	10 (14.3)	10 (50)
	Negativo	8 (11.4)	60 (85.7)	10 (50)
	<i>p</i>		<0.0001 <sup>1</sup>	0.0001 <sup>2</sup>
Hipocalcina	Positivo	62 (88.6)	35 (50)	8 (40)
	Negativo	8 (11.4)	35 (50)	12 (60)
	<i>p</i>		<0.0001 <sup>1</sup>	<0.0001 <sup>2</sup>
$\beta$ -Distroglicano	Positivo	35 (50)	34 (48.6)	10 (50)
	Negativo	35 (50)	36 (51.4)	10 (50)
	<i>p</i>		0.500 <sup>1</sup>	1 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>CS versus CC. <sup>2</sup>CS versus hMSI-H CCR.

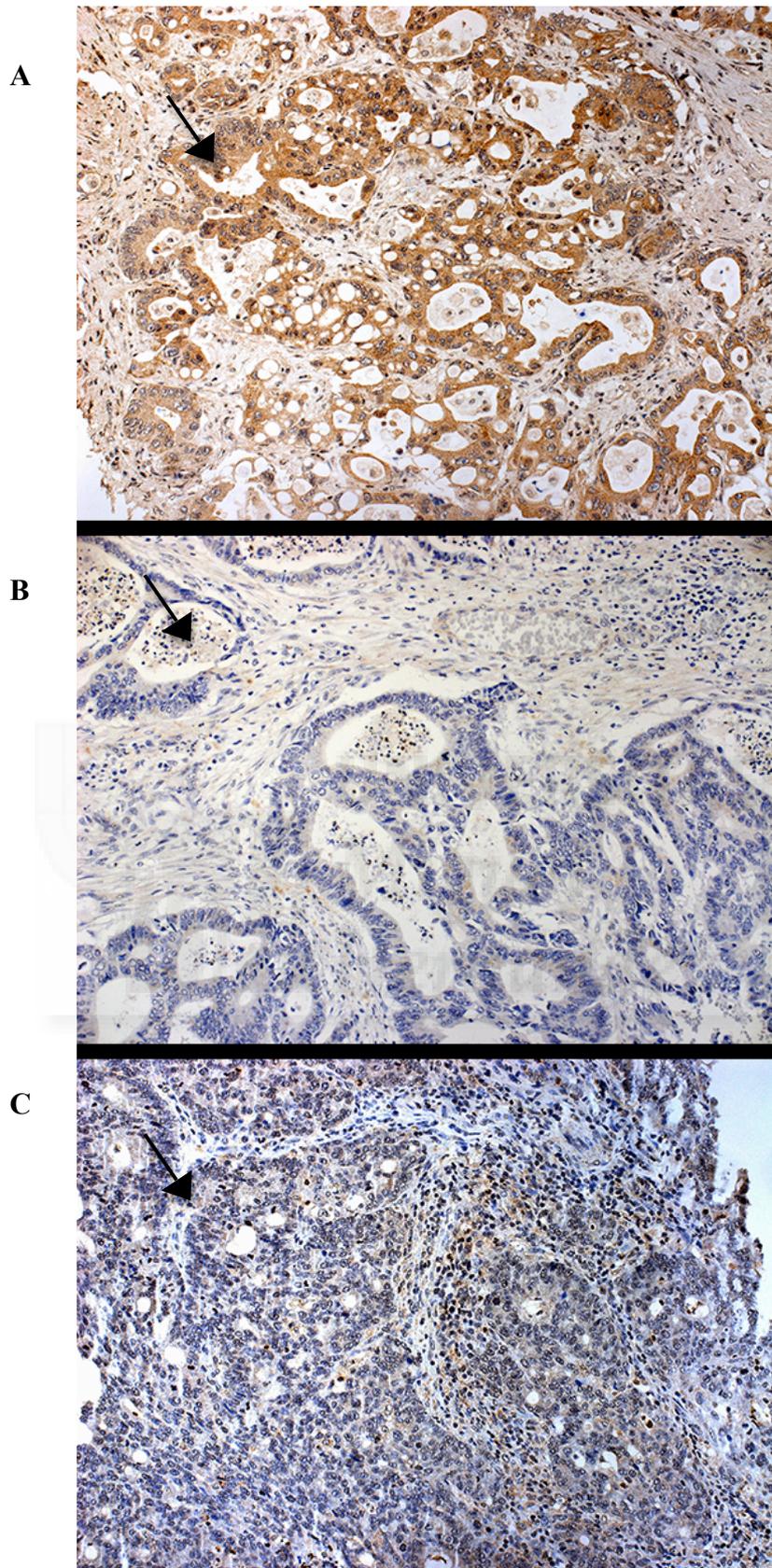
**Tabla 23.** Validación inmunohistoquímica de los marcadores seleccionados en CS, CC y hMSI-H CCR.



**Figura 6.** Expresión de Fascin1 por inmunohistoquímica en (A) CS, (B) CC y (C) CCR hMSI-H. Ampliación 20x.



**Figura 7.** Expresión de Hipocalcina por inmunohistoquímica en (A) CS, (B) CC y (C) CCR hMSI-H. Ampliación 20x excepto para CS que es 40x.



**Figura 8.** Expresión de NAIP por inmunohistoquímica en (A) CS, (B) CC y (C) CCR hMSI-H.  
Ampliación 20x.

## Correlación de la expresión de hipocalcina y NAIP en diferentes subtipos de carcinoma colorrectal.

Como la actividad antiapoptótica de la hipocalcina parece ser ejercida a través de su interacción con NAIP (Mercer EA et al, 2000), se estudió su expresión en las muestras colorectales.

Se observó una fuerte asociación en la expresión de Hipocalcina y NAIP en muestras de CS ( $p=0.002$ ), CC ( $p<0.0001$ ), CCR hMSI-H ( $p=0.008$ ) y en el total de los casos estudiados ( $p<0.0001$ ).

		Hipocalcina			
		Positivo n(%)	Negativo n(%)	<i>p</i>	
NAIP	CS n=39	Positivo	31(88.6)	1(2.5)	0.002
		Negativo	4(11.4)	3(7.5)	
	CC n=32	Positivo	22(100)	1(10)	<0.0001
		Negativo	0	9(90)	
	hMSI-H n=14	Positivo	7(87.5)	1(16.7)	0.008
		Negativo	1(12.5)	5(83.3)	
	Total n=85	Positivo	60(92.3)	3(15)	<0.0001
		Negativo	5(7.7)	17(85)	

**Tabla 24.** Relación entre la expresión de Hipocalcina y NAIP en CS, CC y CCR hMSI-H.

## Modelo predictivo para el diagnóstico entre adenocarcinoma serrado y carcinoma convencional

Con el fin de evaluar si el aumento de Fascina1, Hipocalcina y/o  $\beta$ -Distroglicano pueden utilizarse como prueba diagnóstica para distinguir el CS del CC,

se analizaron los resultados mediante curvas ROC. Este tipo de test estadístico proporciona una representación global de la exactitud diagnóstica. El área bajo la curva oscila entre 1, para una exactitud máxima, y 0,5, para una exactitud mínima. Un valor alto para este tipo de curvas indica que la expresión del marcador en cuestión podría utilizarse como prueba diagnóstica para distinguir entre los dos tipos de muestras.

El mayor AUC (área bajo la curva) se obtuvo para Fascina1 (0.871) con un “odds ratio” de 46.50 seguido de la Hipocalcina (0.693), mostrando ambos la misma sensibilidad (88.6%).

Cuando consideramos la combinación de ambos marcadores, se obtiene una sensibilidad del 100% para la positividad de al menos uno de los dos marcadores. La combinación de ambos dio una alta especificidad (92.9%).

	Fascina1	Hipocalcina	$\beta$ -dístroglicano	Fascina1 e Hipocalcina positivo	Fascina1 o Hipocalcina positivo	Fascina1 e Hipocalcina negativo
<b>Sensibilidad (%)</b>	88.6	88.6	50.0	77.1	100	-
<b>Especificidad (%)</b>	85.7	50	51.4	92.9	42.9	57.1
<b>Valor Predictivo Positivo(%)</b>	86.1	63.9	50.7	91.5	63.6	-
<b>Valor Predictivo Negativo (%)</b>	88.2	81.4	50.7	80.2	100	36.4
<b>Falsos positivos (%)</b>	14.3	50	48.6	7.1	57.1	42.9
<b>Falsos negativos (%)</b>	11.4	11.4	50.0	22.9	0	-
<b>Precisión</b>	87.1	69.3	50.7	85.0	71.4	-
<b>Odds ratio de diagnóstico</b>	46.5	7.75	1.06	43.88	-	-
<b>Índice J de Youden</b>	0.7	0.4	0	0.7	0.4	-
<b>RV(+)</b>	6.2	1.77	1.03	10.8	1.75	-
<b>RV(-)</b>	0.13	0.23	0.97	0.25	-	-
<b>AUC-ROC</b>	0.871	0.693	0.507	0.850	0.714	0.850

RV: razón de verosimilitud, AUC-ROC: área bajo la curva ROC. CS: adenocarcinoma serrado, CC: Carcinoma convencional.

*Tabla 25. Representación de las características de Fascina1, Hipocalcina y  $\beta$ -Distroglicano para el diagnóstico diferencial entre CC y CS.*

### **Modelo predictivo para en diagnóstico entre adenocarcinoma serrado y carcinoma colorrectales con alto grado de inestabilidad de microsatélites.**

Con el análisis de los resultados mediante curvas ROC para Fascina1, Hipocalcina y/o  $\beta$ -Distroglicano al comparar muestras CS y CCR hMSI-H se obtuvieron resultados similares.

En este caso, el mayor AUC se obtuvo para Hipocalcina (0.743) seguido de Fascina1 (0.693) mostrando ambos la misma sensibilidad (88.6%). Cuando consideramos la combinación de ambos marcadores, se obtuvo una sensibilidad del 100%, tanto para la positividad de fascina1 como para hipocalcina. La combinación de ambos marcadores dio una especificidad alta (80%).

	Fascina1	Hipocalcina	$\beta$ - Distroglic.	Fascina1 y Hipocalcina positivo	Fascina1 o Hipocalcina positivo	Fascina1 y Hipocalcina negativo
<b>Sensibilidad (%)</b>	88.6	88.6	50	77.1	100	-
<b>Especificidad (%)</b>	50	60	50	80	30	70
<b>Valor Predictivo Positivo (%)</b>	86.1	88.6	77.8	93.1	83.3	-
<b>Valor Predictivo Negativo (%)</b>	55.6	60	22.2	50	100	16.7
<b>Falsos positivos (%)</b>	50	40	50	20	70	30
<b>Falsos negativos (%)</b>	11.4	11.4	50	22.9	0	-
<b>Precisión</b>	80	82.2	50	77.8	84.4	-
<b>Odds ratio de diagnóstico</b>	7.75	11.63	1	13.5	-	-
<b>Índice J de Youden</b>	0.4	0.5	0	0.6	0.3	-
<b>RV(+)</b>	1.77	2.21	1	3.86	1.43	-
<b>RV(-)</b>	0.23	0.19	1	0.29	-	-
<b>AUC-ROC</b>	0.693	0.743	0.50	0.786	0.650	0.650

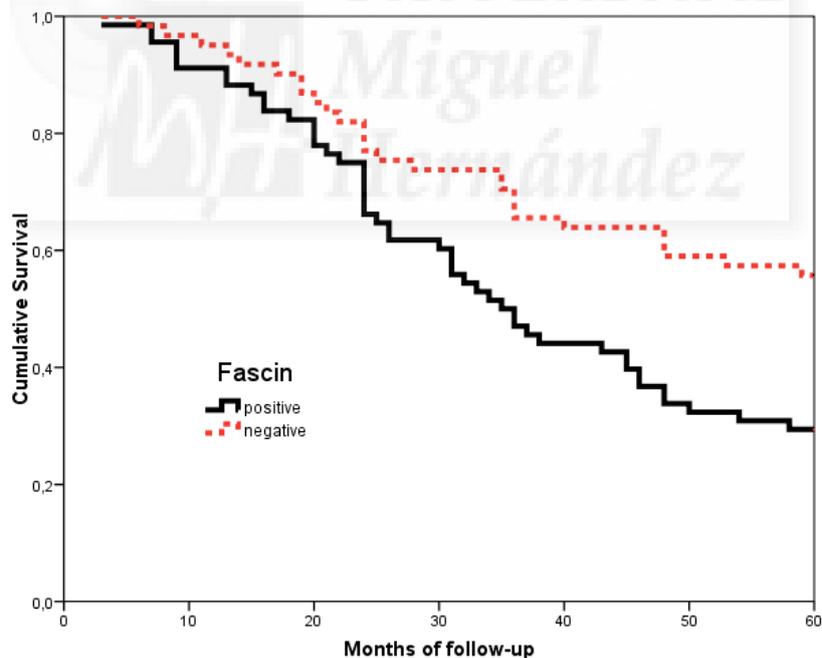
RV: razón de verosimilitud, AUC-ROC: área bajo la curva ROC. CS: Adenocarcinoma serrado, hMSI-H: CCR con alto inestabilidad de microsatélites.

*Tabla 26. Representación de las características de Fascina1, Hipocalcina y  $\beta$ -Distroglicano para el diagnóstico diferencial entre CS y hMSI-H.*

## Análisis de supervivencia

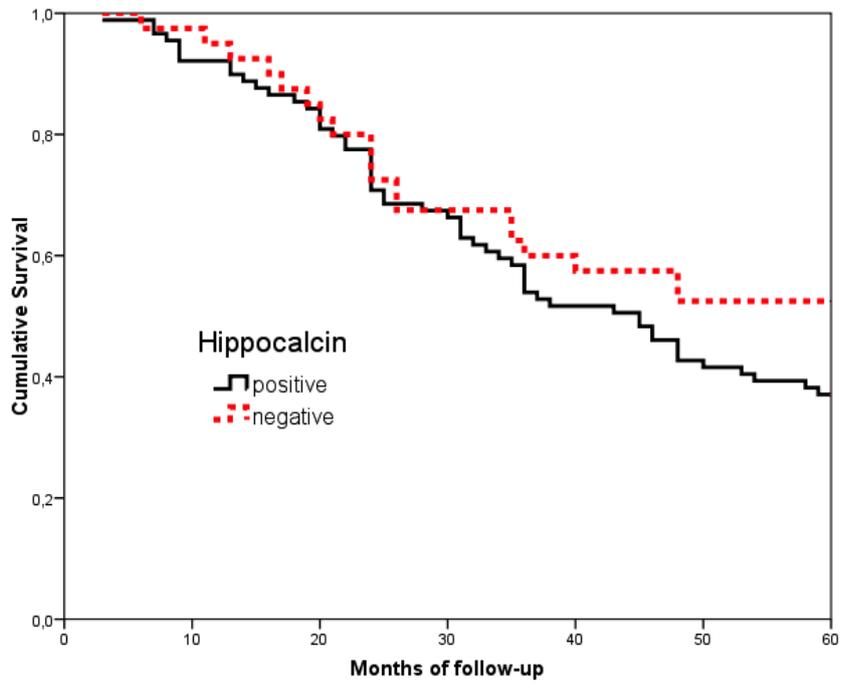
La positividad para la expresión de Fascina1 se asoció con peor pronóstico ( $p = 0.003$ ) (Figura 9) pero no hubo asociación para Hipocalcina ( $p = 0.17$ ) (figura 10) ni para  $\beta$ -Distroglicano ( $p = 0.22$ ) (figura 11), aunque la supervivencia a los 60 años fue peor para Hipocalcina (37% vs 53%). El análisis multivariable solo identificó CS (frente a CC) (HR = 1.8 (CI 95%: 1.2-2.9);  $P = 0.01$ ) y Dukes C (frente a A/B) (HR = 2.6) (CI 95%: 1.6-4.2);  $p < 0.001$ ) como marcadores pronósticos independientes.

En la comparación entre CS y hMSI-H, la localización distal (vs. proximal) fue el único factor pronóstico independiente identificado de peor pronóstico (HR 1.9 (CI 95%: 1.1–3.2);  $p = 0.02$ ).



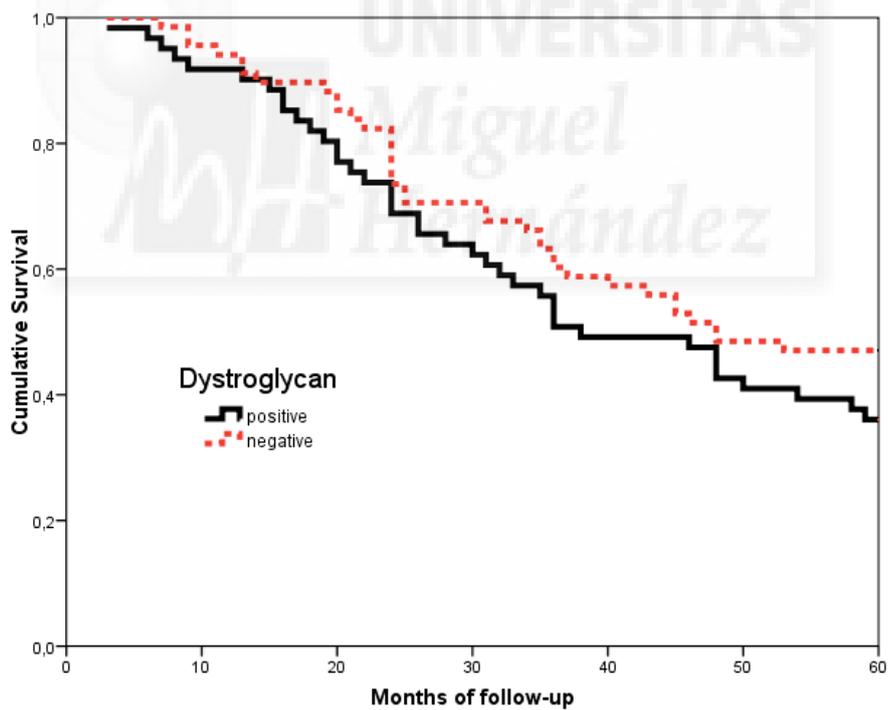
Fascina1:  $p=0.003$

**Figura 9.** Curvas de Kaplan-Meier para Fascina1 con seguimiento a 60 meses.



Hipocalcina:  $p=0.17$

**Figura 10.** Curvas de Kaplan-Meier para Hipocalcina con seguimiento a 60 meses.



$\beta$ -dístroglicano:  $p=0.22$

**Figura 11.** Curvas de Kaplan-Meier para  $\beta$ -dístroglicano con seguimiento a 60 meses.

## **IV.2. Estudio comparativo entre CS y hMSI-H**

### **IV.2.1. Análisis por microarray**

Para las muestras utilizadas en el estudio por microarrays entre CS y CCR hMSI-H no se observaron diferencias significativas en cuanto a características demográficas y clinicopatológicas salvo para el género.

#### **IV.2.1.1. Funciones diferencialmente expresadas**

Los perfiles de expresión génica de la comparación se realizó entre CS (n = 11) y hMSI-H (n = 4) mostraron 44 rutas KEGG diferencialmente expresadas. Entre las rutas KEGG sobreexpresadas en hMSI-H encontramos señalización de receptor tipo toll (hsa04620), procesamiento y presentación de antígenos (hsa04612), enfermedad tiroidea autoinmune (hsa05320), asma (hsa05310), enfermedad de injerto contra huésped (hsa05332), vía de señalización adipocitoquina (hsa04920), rechazo de aloinjertos (hsa05330), vía de detección citosólica de ADN (hsa04623), metabolismo del triptófano (hsa00380) y miocarditis viral (hsa05416). Mientras que entre las rutas sobreexpresadas en CS se encontraron carcinoma basocelular (hsa05217) y sistema de señalización fosfatidilinositol (hsa04070).

De entre estas rutas se observó que los hMSI-H mostraban sobreexpresión de genes relacionados con el sistema inmune (rutas KEGG: presentación y procesamiento antigénico (map04612), señalización del receptor tipo Toll (map04620), señalización de quimiocinas (map04062) y receptor de interacción citoquina-citoquina (map04060)). Estas rutas se muestran a continuación.

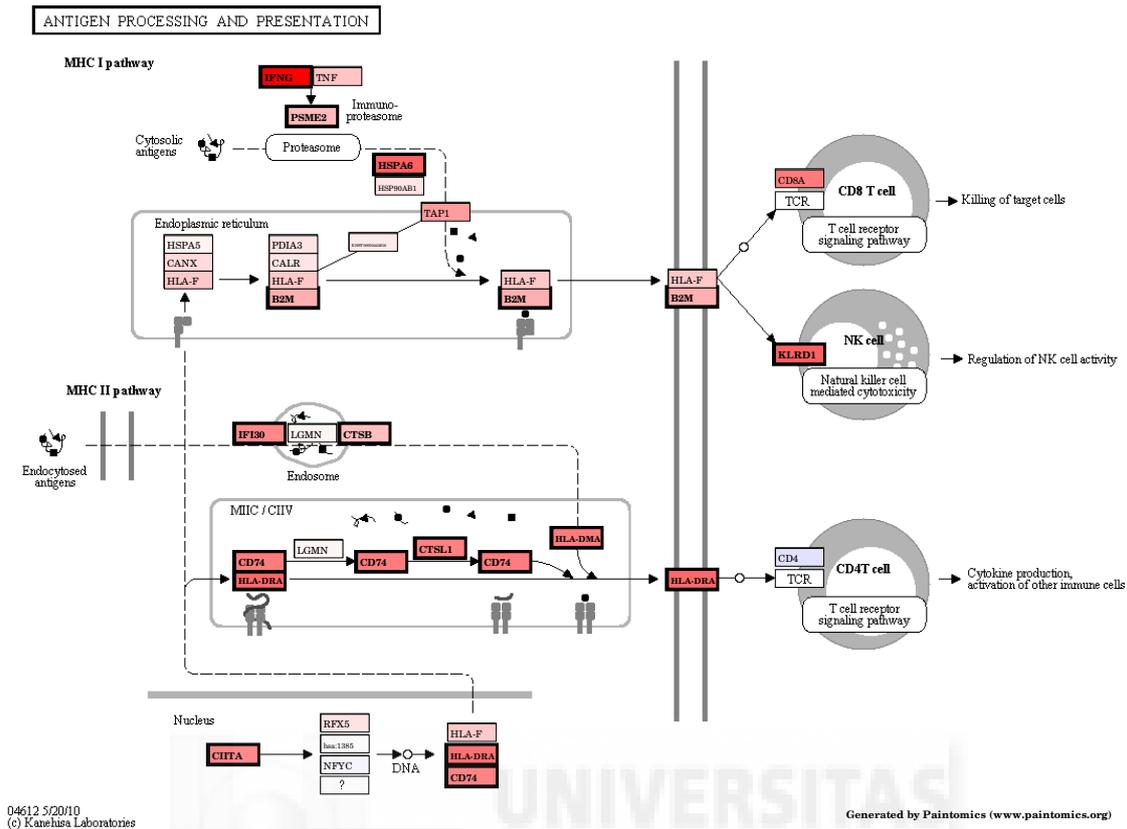


Figura 12. Procesamiento y presentación antigénico (www.paintomics.org).

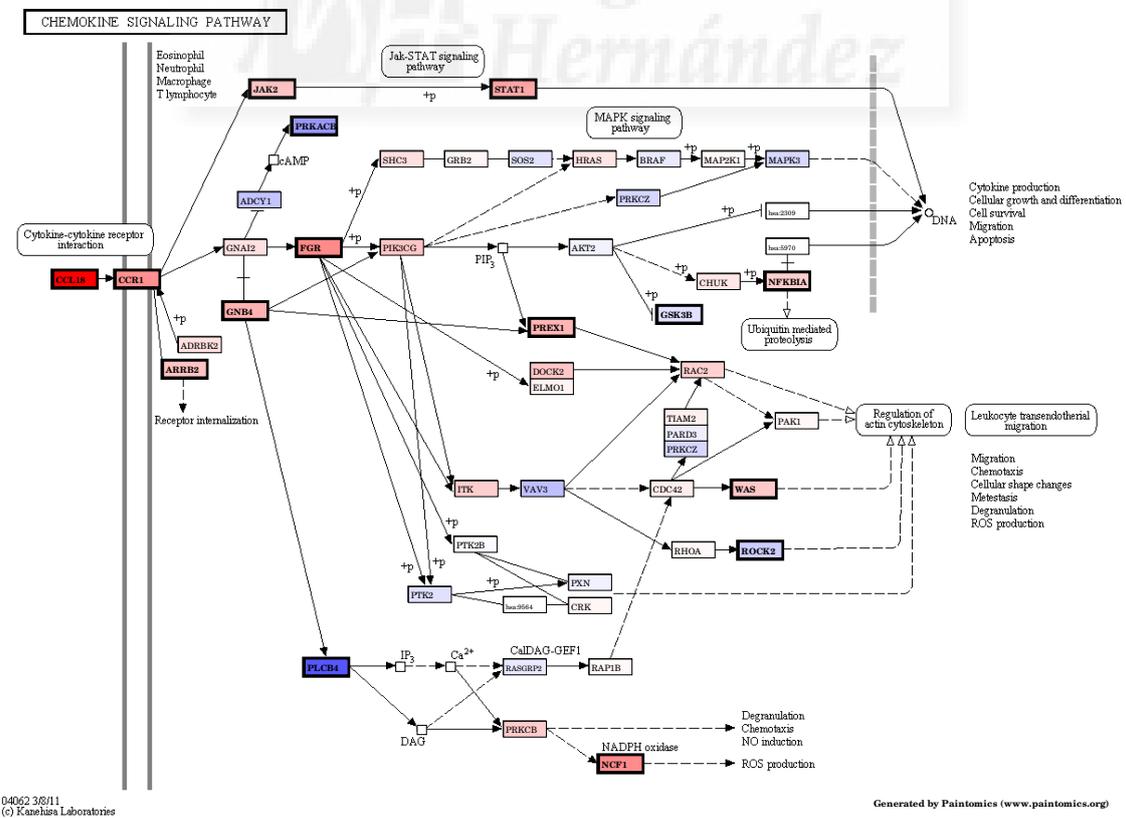
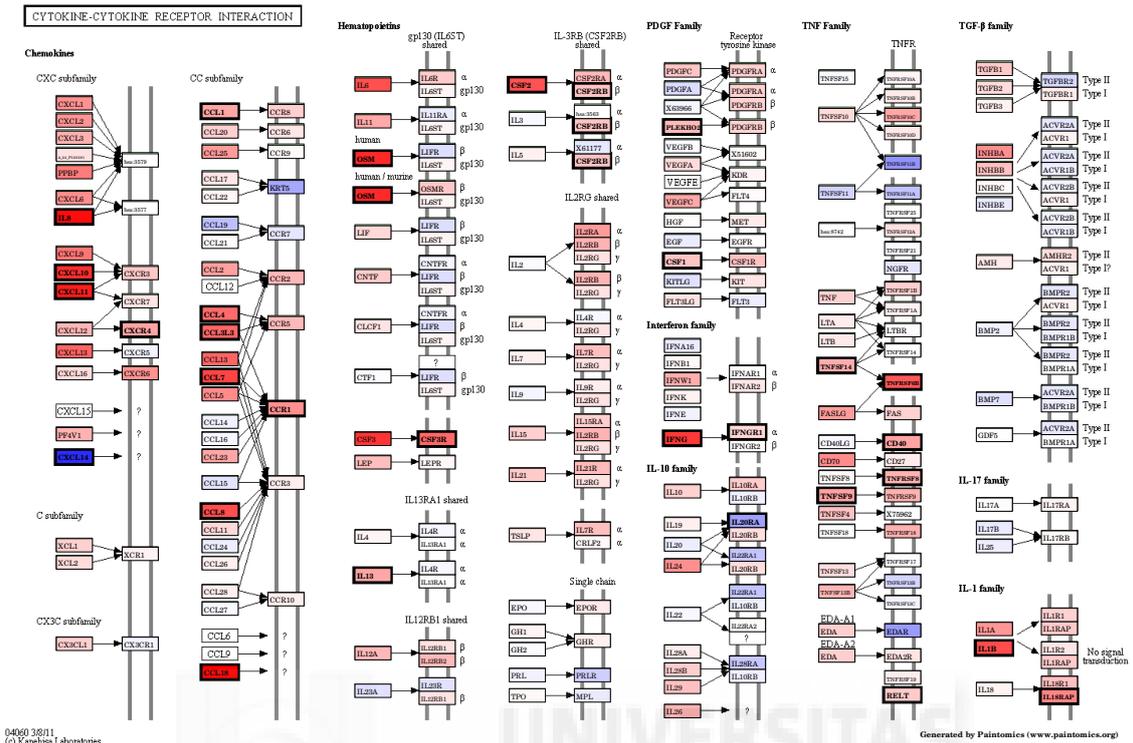
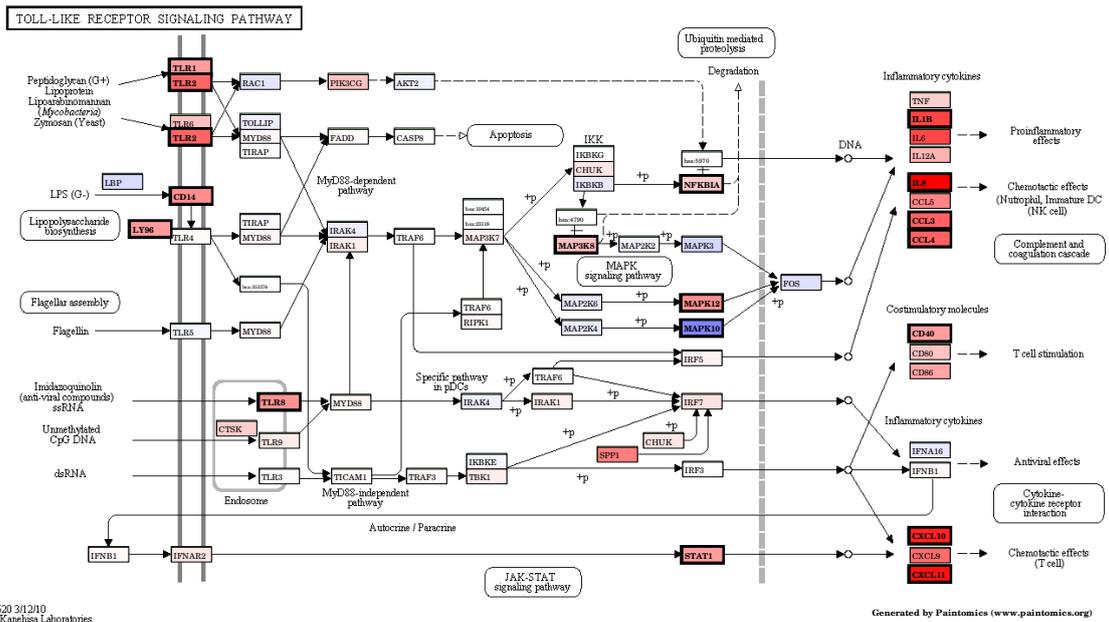


Figura 13. Ruta de señalización quimioquina (www.paintomics.org).

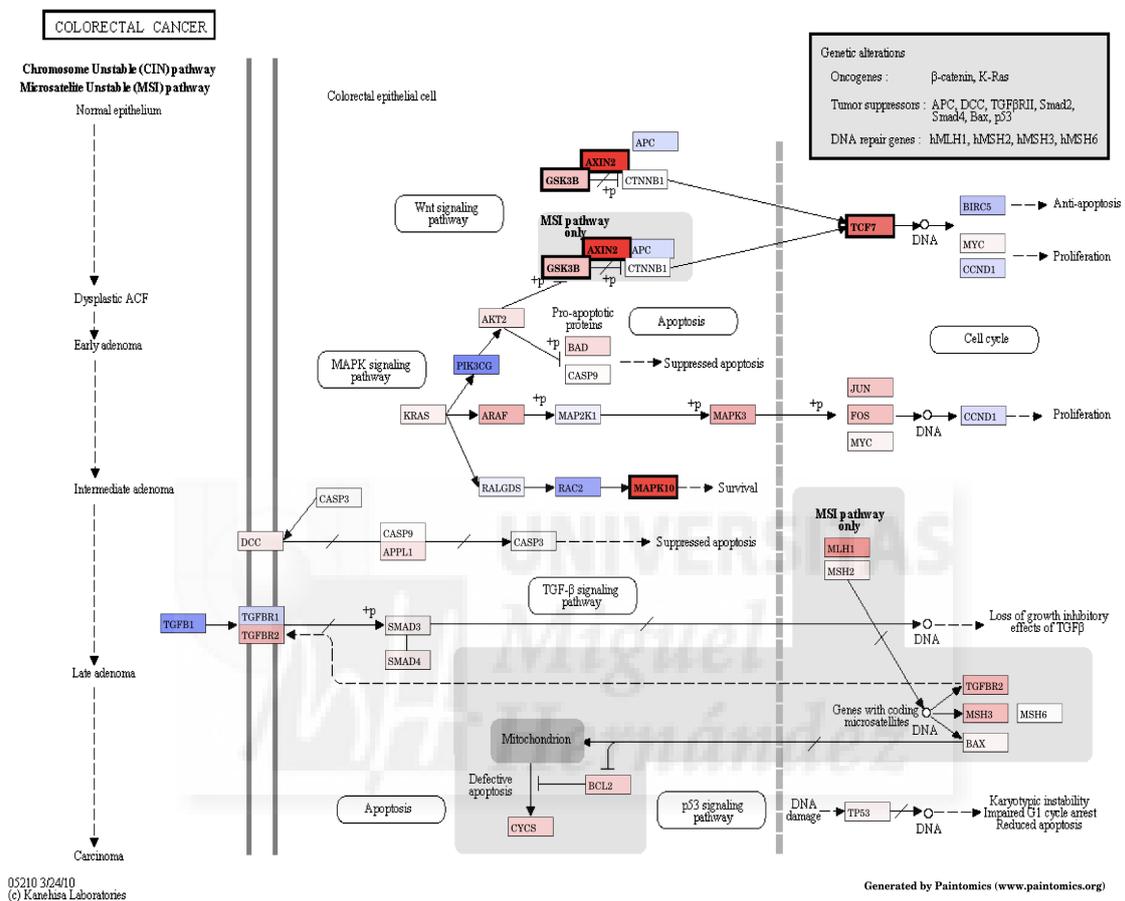


**Figura 14.** Ruta de señalización receptor de interacción citoquina-citoquina (www.paintomics.org).



**Figura 15.** Ruta de señalización del receptor tipo Toll (www.paintomics.org).

La figura 16 muestra una visión general por "paintomics" de las proteínas relacionadas con el CCR y rutas KEGG que son expresadas diferencialmente entre hMSI-H (en azul) y SC (en rojo).



**Figura 16.** Proteínas relacionadas con el CCR y rutas KEGG diferencialmente expresadas entre hMSI-H (en azul) y SC (en rojo) (www.paintomics.org).

En cuanto a Gene Ontology, de la base de datos de proceso biológico GO, se encontraron 436 procesos GO expresados significativamente entre hMSI-H y CS. Tras el filtrado por percentiles, se obtuvieron 32 funciones diferencialmente expresadas en hMSI-H. Entre estos procesos biológicos encontramos: función inmune (producción de IL-12 (uno), ruta señalización receptor tipo Toll (una), respuesta inflamatoria aguda (uno) y crónica (uno)), regulación positiva de síntesis de óxido nítrico (NO) (uno),

activación de células mastoides (uno), procesamiento y presentación de antígenos (tres), regulación de la actividad de las MAP quinasas (dos), regulación de la cascada de las MAP quinasa (dos), regulación de proteínas de transporte al núcleo (dos), respuesta a bacterias (cuatro), regulación de la replicación de genoma viral (uno) y respuesta a ARN bicatenario (uno), detección de estímulo biótico (uno), biogénesis ribosomal (uno), proceso metabólico de glucolípidos (uno), regulación positiva de la actividad hidrolasa (uno) de proteína quinasa (uno) actividad tranferasa (uno) fosforilación de tirosina de la proteína Stat1 (uno), regulación negativa de unión al ADN (uno) y respuesta a lesiones (uno).

En cuanto a la base de datos GO de componente celular, se obtuvieron 37 componentes diferencialmente expresados entre hMSI-H y CS. Entre los componentes celulares aumentados en CCR hMSI-H encontramos: componentes relacionados con la presentación de antígenos (proteína del complejo MHC clase I y MHC clase II), orgánulos relacionados con procesos de digestión (vacuolas, lisosomas, peroxisomas), relacionados con la síntesis de proteína (ribosoma (dos), subunidad pequeña ribosomal (dos), complejo ribonucleoproteína), complejo activador del proteasoma, cromosoma, cromatina y nucleosoma entre otros. Entre los componentes celulares incrementados en CS: mitocondria (membrana y cadena respiratoria mitocondrial (dos)), citoesqueto (dos), unión complejo apical, unión celular (dos) y aparato de Golgi.

De función molecular GO se obtuvieron 73 funciones, de las que al filtrar los datos quedaron 16 funciones sobreexpresadas en hMSI-H que estaban relacionadas con el receptor de quimioquinas (dos), bradicinina (uno), receptor de trombina (uno), receptor acoplado a proteínas G (receptor nucleótidos de purina (uno) y nucleótidos de

purina acoplados a proteínas G (uno), receptor de N-formil péptidos (uno), unión a lipoproteínas de baja densidad (uno), unión a lipoproteínas (uno), opsonina (uno), unión de azúcar (uno), peptidoglicano (uno), proteína de unión a MHC (uno), unión a péptidos (uno) y quimioquinas (uno).

#### IV.2.1.2. Genes diferencialmente expresados

Tras el estudio por microarrays de los perfiles de expresión génica de ARNm entre 11 muestras de CS y 4 CCRs esporádicos con características moleculares e histológicas de hMSI-H los resultados revelaron numerosos genes diferencialmente expresados entre ambos.

El análisis de los perfiles de expresión ARNm entre CS y hMSI-H CCR identificaron 972 RNAs diferencialmente expresados, de los cuales 533 estaban sobreexpresados en hMSI-H y 439 reducidos. De entre los genes diferencialmente expresados se muestran en la tabla siguiente los de mayor significación estadística:

Símbolo	Nombre del gen	Función de la proteína	Estadístico	Relación de cambio	P valor bruto	P valor ajustado
AK096134	Long intergenic non-protein coding RNA 1093		7,279	2,882	3,15E-09	5,44E-05
DMRTC2	DMRT-like family C2		7,038	1,156	7,30E-09	5,44E-05
CLEC4A	C-type lectin domain family 4	Adhesión celular, señalización célula-célula y participa en la respuesta inmune e inflamatoria	6,375	2,626	7,37E-08	0,0003
MCHR1	Melanin-concentrating hormone receptor 1	Inhibe la acumulación de AMPc, estimula el flujo de calcio intracelular.	6,352	2,864	8,00E-08	0,0003

SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	Une a los subproductos de superóxido de la fosforilación oxidativa y los convierte en peróxido de hidrógeno y oxígeno diatómico.	6,351	3,270	8,02E-08	0,0003
LILRA3	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A	Actúa como receptor soluble de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I	6,339	3,290	8,35E-08	0,0003
CMTM2	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2	Participa en el desarrollo testicular	6,238	3,676	1,19E-07	0,0003
CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor	Citoquina que controla la producción, diferenciación y función de los granulocitos.	6,191	3,143	1,40E-07	0,0003
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	Glicoproteína de la superficie celular, se expresa en células endoteliales y del sistema inmune	6,147	2,884	1,63E-07	0,0003
GPR84	G protein-coupled receptor 84	Supuesto receptor de ácidos grasos de cadena media	6,146	2,828	1,64E-07	0,0003
CD14	CD14 molecule	Media la respuesta del sistema inmune al lipopolisacárido bacteriano	6,076	2,235	2,09E-07	0,0004
C19orf59	Mast cell-expressed membrane protein 1	Se especula estar involucrado en la regulación de la diferenciación de los mastocitos o respuesta inmune.	6,010	4,319	2,63E-07	0,0004
FPR2	Formyl peptide receptor 2	Receptor acoplado a proteínas G que participa en reacciones inflamatorias	6,010	4,630	2,63E-07	0,0004
CCL3L3	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	Participa en procesos inflamatorios e inmunoreguladores	5,949	3,167	3,25E-07	0,0004
FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity Ila, receptor (CD32)	Receptor de la superficie celular de células fagocíticas.	5,944	3,090	3,31E-07	0,0004

CRCP	CGRP receptor component	Proteína de membrana. Incrementa los niveles de AMPc intracelular.	-4,726	-0,954	2,13E-05	0,0053
CXCL14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Involucrada en procesos inmunoreguladores e inflamatorios	-4,753	-4,400	1,94E-05	0,0050
GPR56	G protein-coupled receptor 56	Proteína de unión a la transglutaminasa 2, un componente del tejido y estroma tumoral implicado como inhibidor de la progresión del tumor	-4,794	-1,593	1,69E-05	0,0048
ZNF140	Zinc finger protein 140		-4,838	-1,205	1,46E-05	0,0044
CDK20	Cyclin-dependent kinase 20	Activa quinasas dependiente de ciclina 2 y está implicada en el crecimiento celular	-4,869	-1,412	1,32E-05	0,0041
PAQR8	Progesterin and adipoQ receptor family member VIII		-4,890	-2,273	1,23E-05	0,0039
AK056630	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	Proteínas reguladoras de la transcripción	-4,918	-1,444	1,12E-05	0,0037
SAMD13	Sterile alpha motif domain containing 13		-4,936	-3,939	1,05E-05	0,0036
KCNMB3	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3	Subunidad beta que puede activar parcialmente o ligeramente disminuir el tiempo de activación de la subunidad alfa MaxiK.	-4,949	-1,692	1,01E-05	0,0035
TUFT1	Tuftelin 1		-4,995	-1,755	8,60E-06	0,0032
SLC48A1	Solute carrier family 48 (heme transporter), member 1		-5,009	-1,044	8,22E-06	0,0031
LMF1	Lipase maturation factor 1	Implicada en maduración y transporte de la lipoproteína lipasa a través de la vía secretora.	-5,030	-0,908	7,66E-06	0,0030
LGR6	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 6	Receptor hormonal glicoproteico	-5,040	-3,886	7,41E-06	0,0030

TMEM8B	Transmembrane protein 8B	Recientemente identificado con gen supresor tumoral	-5,062	-1,401	6,88E-06	0,0029
AXIN2	Axin 2	Participa en la regulación de la estabilidad de la vía de señalización de Wnt beta-catenina	-5,179	-2,471	4,61E-06	0,0022
C10orf58	Family with sequence similarity 213, member A		-5,211	-1,573	4,14E-06	0,0021
PRKACB	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	Miembro de la familia de proteínas con actividad Ser/Thr	-5,220	-2,171	4,01E-06	0,0021
GTF2IRD2	GTF2I repeat domain containing 2	Podría funcionar como regulador de la transcripción	-5,320	-1,270	2,85E-06	0,0016
C9orf128	Family with sequence similarity 221, member B		-5,326	-3,686	2,79E-06	0,0016
FANK1	Fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1	Interacciona con Jab 1 y activa c Jun endógeno	-5,545	-2,324	1,32E-06	0,0009
MTMR8	Myotubularin related protein 8	Codifica una proteína que contiene dominio de unión fosfoinositol y un dominio de interacción SET	-5,601	-1,781	1,09E-06	0,0009

**Tabla 27.** Muestra los ARNms más diferencialmente expresados entre hMSI-H CCR y CS obtenidos de los perfiles moleculares para los que se conoce el nombre del gen.

Para realizar el análisis de validación por qPCR se eligieron, de entre los genes más significativos, aquellos relacionados con el sistema inmune: *CSF3R* ( $p=0,0004$ ) e *ICAM-1* ( $p=0,0003$ ) entre los sobreexpresados en hMSI-H y *CXCL14* ( $p=0,0050$ ) y *CRCP* ( $p=0,0053$ ) entre los sobreexpresados en CS.

#### **IV.2.1.3. Funciones celulares de los genes seleccionados**

*CRCP* (7q11.21), péptido relacionado con el gen calcitonina, un neuropéptido de 37 aminoácidos, que induce aumento de los niveles de AMPc intracelular ([www.omim.org](http://www.omim.org)). La liberación de CGRP juega un papel clave en la homeostasis del tracto gastrointestinal (**Kaur R et al, 2009**).

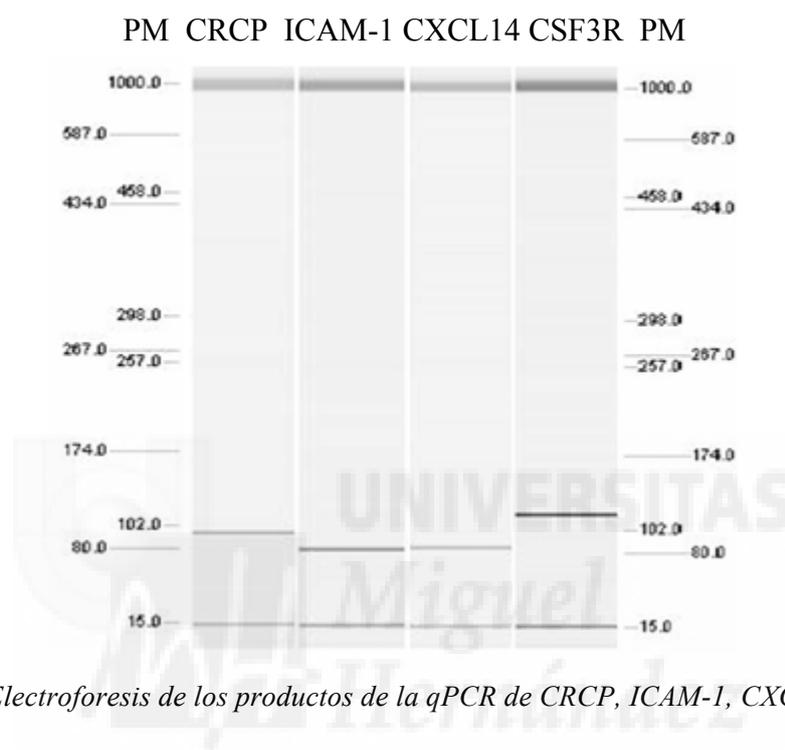
La proteína que codifica el gen *ICAM-1* (19p13.2) es una molécula de adhesión intercelular. Participa en los procesos inflamatorios, promoviendo la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular de la pared (**Rothlein RD, 1986**).

*CXCL14* (5q31.1) es un gen que pertenece a la familia de genes que codifican proteínas secretadas que intervienen en los procesos de inmunorregulación e inflamación. Esta quimiocina muestra actividad quimiotáctica para monocitos pero no para los linfocitos, células dendríticas, neutrófilos o macrófagos (**Kurth I et al, 2001**).

*CSF3R* (1p34.3). El factor estimulante de colonias de granulocitos o CSF3, es una glicoproteína que se produce por los macrófagos estimulados con endotoxinas. Desempeña un papel importante en la granulopoyesis durante el proceso inflamatorio (**Inazawa J et al, 1991**).

#### IV.2.2. Expresión por qPCR

Tras realizar la cuantificación de ARNm por qPCR se realizó una electroforesis del producto amplificado para comprobar que el peso molecular (PM) coincidía con el esperado y no se amplificaba más de un producto.



**Figura 17.** Electroforesis de los productos de la qPCR de CRCP, ICAM-1, CXCL14 y CSF3R.

Las muestras utilizadas en la comparación entre CS y CCR hMSI-H estaban emparejadas excepto por el grado y estadiaje M para las muestras incluidas en el estudio de los genes *CXCL14*, *CSF3R*, *CRCP* y *ICAM1*.

Los resultados de la comparación de muestras CCR hMSI-H tumoral y CS tumoral (Tabla 28) mostraron mayor expresión a nivel de ARNm para *CSF3R* y *ICAM-1* en muestras CCR hMSI-H tumoral y mayor expresión de *CXCL14* y *CRCP* en muestras CS tumoral acorde con los datos obtenidos de la expresión génica por microarrays, siendo significativos para *ICAM-1* ( $p = 0,036$ ) y *CRCP* ( $p = 0,029$ ).

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	p
CRCP	hMSI-Ht	0,085 $\pm$ 0,106	0,030	0,143	9	
	CSt	0,374 $\pm$ 0,562	0,131	0,285	22	0,029
CXCL14	hMSI-Ht	2,362 $\pm$ 4,012	0,292	3,865	9	
	CSt	7,043 $\pm$ 11,461	1,298	6,065	22	0,094
CSFR3R	hMSI-Ht	0,183 $\pm$ 0,366	0,019	0,231	9	
	CSt	0,156 $\pm$ 0,199	0,092	0,182	23	0,301
ICAM-1	hMSI-Ht	0,121 $\pm$ 0,167	0,121	0,254	8	
	CSt	0,024 $\pm$ 0,025	0,016	0,029	21	0,036

**Tabla 28.** Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H tumorales y CS normales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

Con el fin de investigar si se producía cambio en la expresión de los genes seleccionados en las muestras tumorales con las normales se realizaron distintas comparaciones. De la comparación entre muestras hMSI-H tumorales y hMSI-H normales (Tabla 29) a nivel de ARNm se obtienen resultados significativos para *ICAM-1* ( $p = 0,003$ ) con mayor expresión en tejido tumoral. Para *CRCP* se observa mayor expresión en tejido tumoral y para *CSFR3R*, y *CXCL14* mayor expresión en tejido normal sin significación estadística.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	p
CRCP	hMSI-Ht	0,085 $\pm$ 0,106	0,030	0,143	9	
	hMSI-Hn	0,058 $\pm$ 0,059	0,037	0,111	6	0,689
CXCL14	hMSI-Ht	2,362 $\pm$ 4,012	0,292	3,865	9	
	hMSI-Hn	9,644 $\pm$ 10,144	5,617	19,762	6	0,066
CSFR3R	hMSI-Ht	0,183 $\pm$ 0,366	0,019	0,231	9	
	hMSI-Hn	0,303 $\pm$ 0,398	0,151	0,554	6	0,388
ICAM-1	hMSI-Ht	0,121 $\pm$ 0,167	0,121	0,254	8	
	hMSI-Hn	0,007 $\pm$ 0,008	0,005	0,011	5	0,003

**Tabla 29.** Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H tumorales y CCR hMSI-H normales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

En la comparación entre muestras CS tumorales y CS normales (Tabla 30) solo se obtiene significación estadística para *CRCP* ( $p = 0,028$ ) con mayor expresión en tejido tumoral.

Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	p
CRCP	CSt	0,374 $\pm$ 0,562	0,131	0,285	22	
	CSn	0,063 $\pm$ 0,051	0,048	0,084	7	0,028
CXCL14	CSt	7,043 $\pm$ 11,461	1,298	6,065	22	
	CSn	5,400 $\pm$ 5,559	2,862	7,808	6	0,469
CSFR3R	CSt	0,156 $\pm$ 0,199	0,092	0,182	23	
	CSn	0,366 $\pm$ 0,464	0,144	0,919	7	0,335
ICAM-1	CSt	0,024 $\pm$ 0,025	0,016	0,029	21	
	CSn	0,013 $\pm$ 0,012	0,013	0,019	4	0,496

**Tabla 30.** Resultados qPCR al comparar muestras CS tumorales y CS normales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

De la comparación entre todas las muestras CCR hMSI-H y CS de tejido tumoral (Tabla 31) con las CCR hMSI-H y CS de tejido normal se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para *CRCP* ( $p = 0,026$ ) e *ICAM-1* ( $p = 0,014$ ) que mostraron mayor expresión en tejido tumoral.

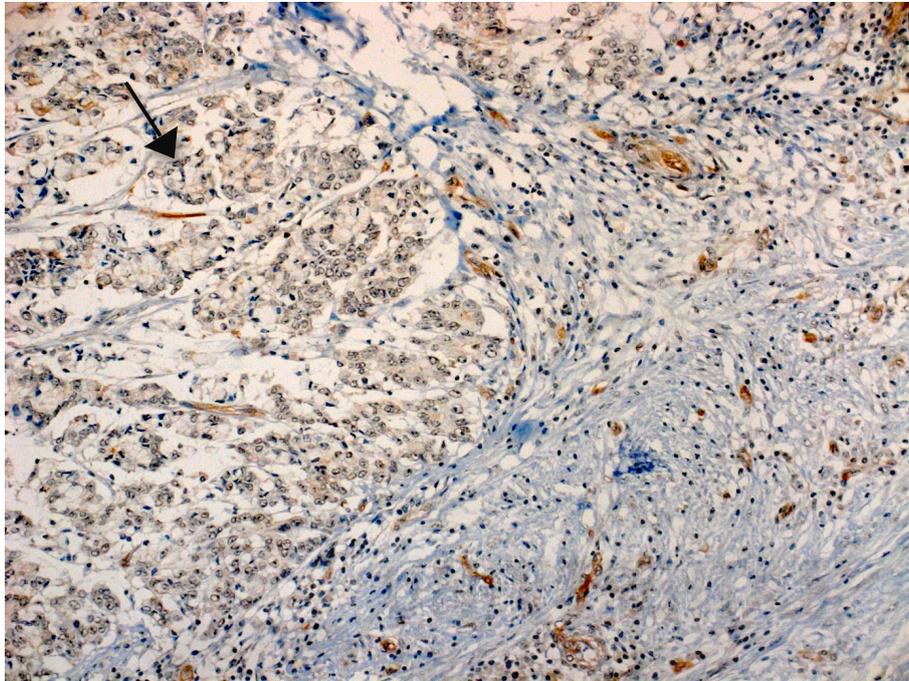
Gen	Tipo muestra	Media $\pm$ DS	Mediana	R. Inter.	n	p
CRCP	hMSI-Ht y CSt	0,290 $\pm$ 0,492	0,109	0,184	31	
	hMSI-Hn y CSn	0,061 $\pm$ 0,053	0,048	0,093	13	0,026
CXCL14	hMSI-Ht y CSt	5,684 $\pm$ 10,046	1,190	4,930	31	
	hMSI-Hn y CSn	7,359 $\pm$ 7,949	2,863	10,770	13	0,097
CSFR3R	hMSI-Ht y CSt	0,166 $\pm$ 0,250	0,078	0,191	32	
	hMSI-Hn y CSn	0,337 $\pm$ 0,419	0,144	0,651	13	0,161
ICAM-1	hMSI-Ht y CSt	0,051 $\pm$ 0,097	0,026	0,034	29	
	hMSI-Hn y CSn	0,010 $\pm$ 0,009	0,005	0,018	9	0,014

**Tabla 31.** Resultados qPCR al comparar muestras CCR hMSI-H y CS tumorales con CCR hMSI-H y CS normales. La tabla muestra la media de ARNm por copia de  $\beta$ -actina, la desviación estándar de los datos (DS), la mediana, y el rango intercuartil. N es el número de muestras utilizadas. El valor de p es el obtenido cuando se aplica la prueba U de Mann – Whitney.

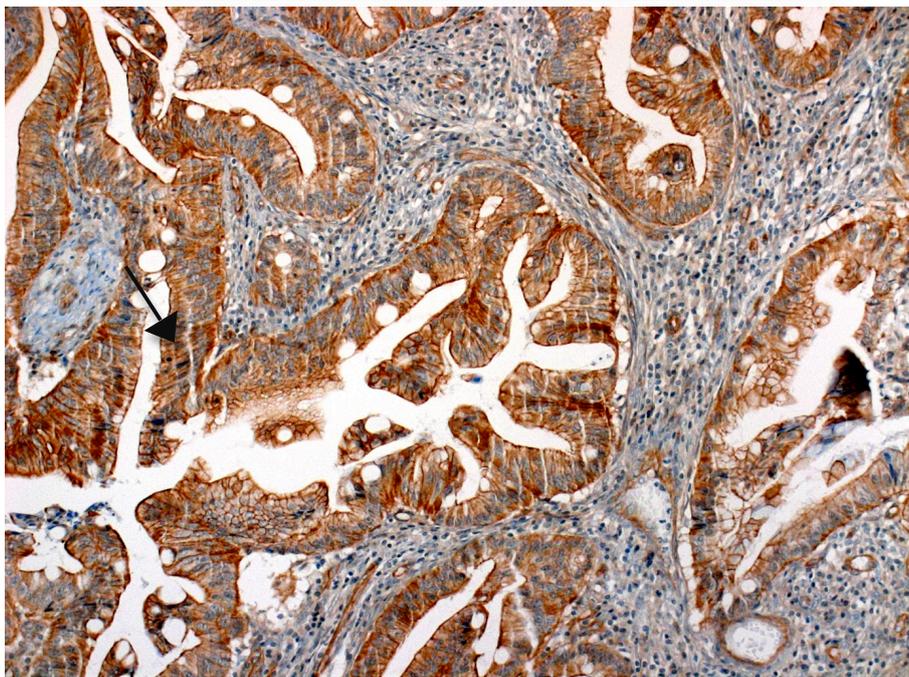
### IV.2.3. Expresión por inmunohistoquímica

Tras los resultados por PCR cuantitativa se decidió estudiar la expresión a nivel de proteína por inmunohistoquímica para CRCP, CXCL14, ICAM-1.

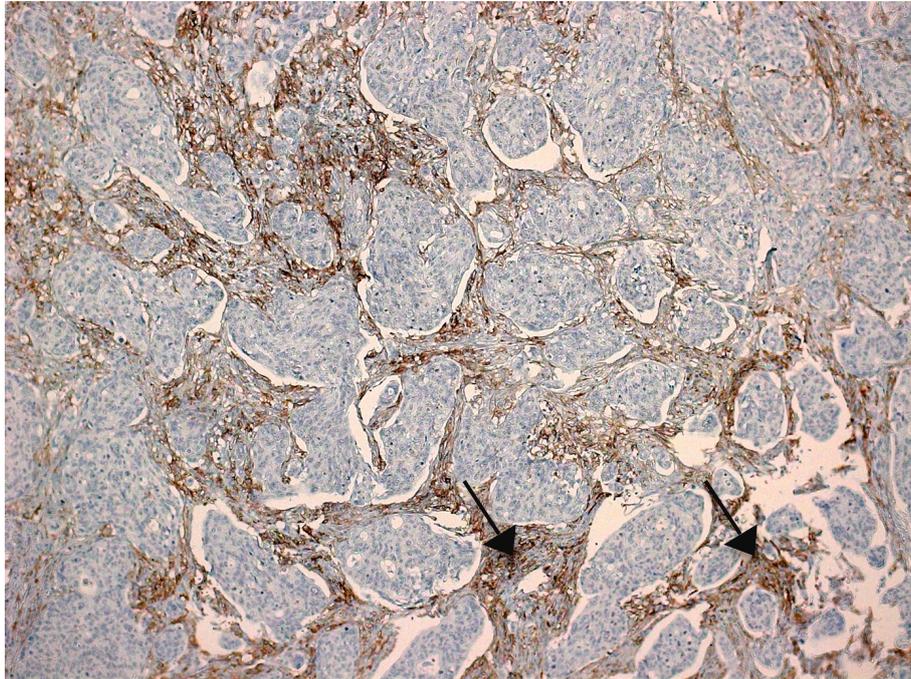
Las muestras utilizadas para su estudio por inmunohistoquímica entre CS y CCR hMSI-H estaban emparejadas en cuanto a las características demográficas y clinicopatológicas salvo para el grado.



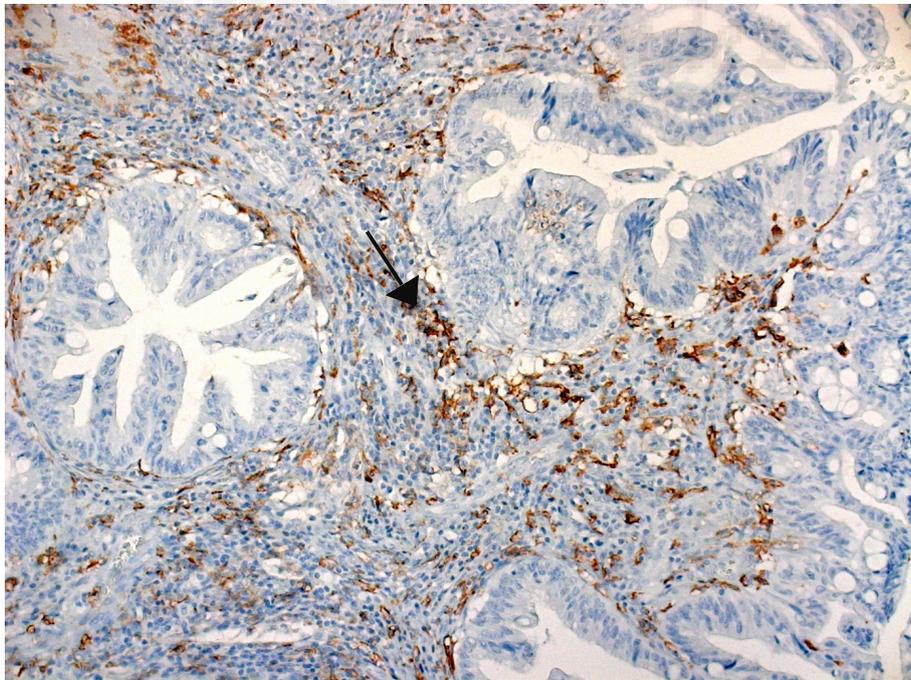
*Figura 18. Expresión de CRCP por inmunohistoquímica en CCR hMSI-H.*



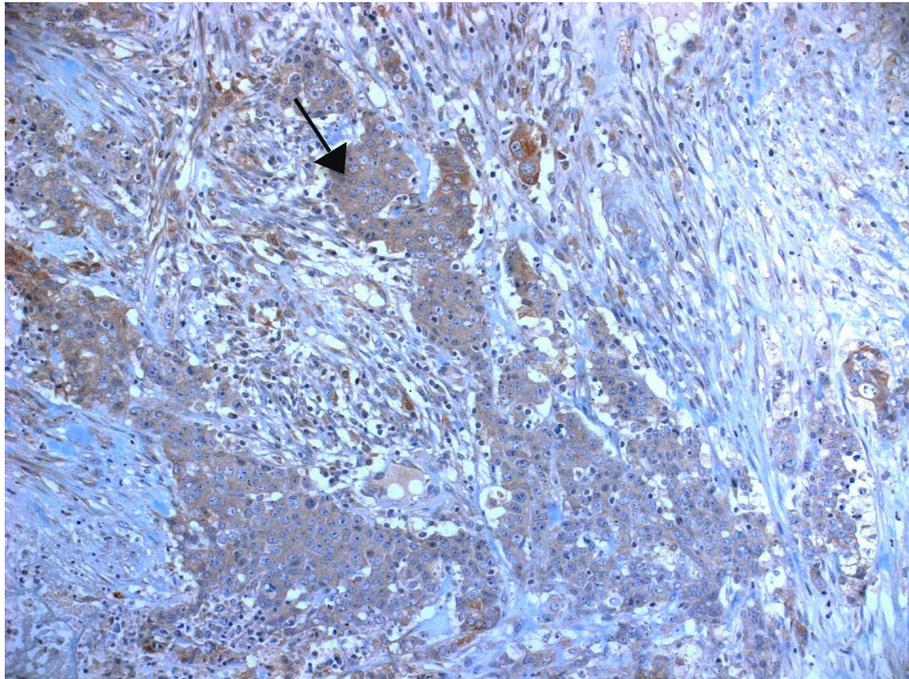
*Figura 19. Expresión de CRCP por inmunohistoquímica en CS.*



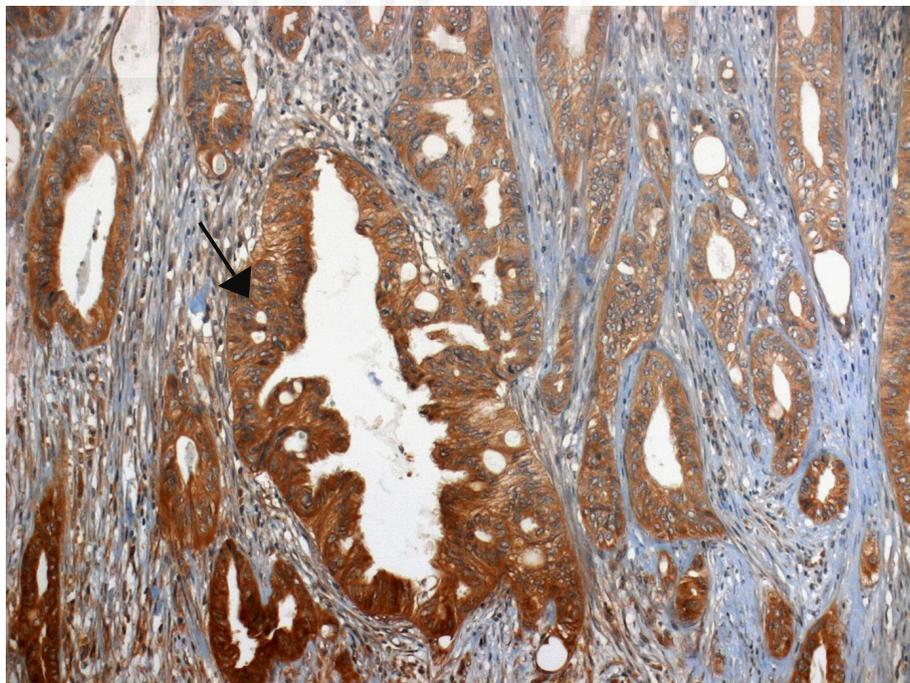
**Figura 20.** Expresión de ICAM-1 por inmunohistoquímica en CCR hMSI-H. X20



**Figura 21.** Expresión de ICAM-1 por inmunohistoquímica en CS. X40.



*Figura 22. Expresión de CXCL14 por inmunohistoquímica en CCR hMSI-H. X20*



*Figura 23. Expresión de CXCL14 por inmunohistoquímica en CS. X20.*

En concordancia con los resultados del microarray, a expresión de CRCP y CXCL14 fue mayor en CS frente a muestras de CCR hMSI-H, tanto en centro del tumor como en el frente invasivo, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Para ICAM-1 la expresión fue mayor en CCR hMSI-H pero sin significancia estadística.

	Centro del tumor		Frente invasivo		
	CS, n (%)	hMSI-H, n (%)	CS, n (%)	hMSI-H, n (%)	
<b>CRCP</b>	n	10	14	10	12
	Positivo	7 (70)	7 (50)	7 (70)	6 (50)
	Negativo	3 (30)	7 (50)	3 (30)	6 (50)
	<i>p</i>		0.290		0.305
<b>CXCL14</b>	n	6	9	6	10
	Positivo	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)
	Negativo	5 (83.3)	9 (100)	5 (83.3)	10 (100)
	<i>p</i>		0.400		0.375
<b>ICAM-1</b>	n	10	15	10	15
	Positivo	6 (60)	11 (73.3)	9 (90)	15 (100)
	Negativo	4 (40)	4 (26.7)	1 (10)	0 (0)
	<i>p</i>		0.3931		0.400

**Tabla 32.** Relación de la expresión de CRCP, CXCL14 e ICAM-1 en CS y CCR hMSI-H.

## V. DISCUSIÓN





## V. DISCUSION

El análisis por microarrays nos da información de una multitud de genes que se encuentran diferenciados de forma significativa en los tejidos analizados y es de gran ayuda para la identificación de marcadores que puedan ser empleados para el diagnóstico de estas entidades o puedan constituir dianas moleculares para el tratamiento individualizado.

El adenocarcinoma serrado es un CCR recientemente reconocido por la OMS. Debido a su carácter agresivo y su peor pronóstico (**García-Solano J et al, 2010**) es fundamental conocer diferencias a nivel molecular y encontrar marcadores diferenciales con otros subtipos que puedan ser de utilidad para realizar un seguimiento y un tratamiento específico adecuado a las características de este tumor.

Del estudio de perfil de expresión génica por microarrays entre CS con CC destacan como funciones diferencialmente expresadas las relacionadas con morfogénesis, hipoxia (como señalización VEGF) y membrana. Estas funciones, relacionadas con el citoesqueleto y componentes celulares, son compatibles con la morfología serrada, las características invasivas del CS y los diferentes patrones de expresión de proteínas involucradas en la vía Wnt-beta catenina (**García-Solano J et al, 2012a**). Las funciones relacionadas con el sistema inmune (señalización células B, ruta del receptor Fc) podrían estar asociadas con la respuesta linfocítica peritumoral más débil encontrada en CS (**García-Solano J et al, 2011**). Aunque el número de funciones diferencialmente expresados en CS y CC es considerable, detectamos solo unas pocas diferencias en la expresión diferencial de los genes.

La importancia y la significación de las funciones encontradas por FatiScan, se sugieren una clara respuesta transcripcional coordinada que se dirige a funciones celulares específicas. Además, el fuerte poder predictivo detectado de los genes expresados diferencialmente indica una alta consistencia en las principales diferencias transcripcionales entre los dos tipos de tejidos.

La *fascina1* se expresa en células dendríticas maduras, células mesenquimales, células endoteliales y en las neuronas durante desarrollo y en el adulto. Está ausente en el epitelio normal, pero se expresa en múltiples neoplasias epiteliales, incluyendo carcinomas de páncreas, pulmón, esófago, estómago y mama (**Hashimoto Y et al, 2006**).

La *fascina1* es una proteína localizada en el núcleo central de los haces de actina, en el filopodio del borde delantero de las células migratorias y se ha visto que incrementa la migración en distintos tipos celulares (**Kureishy N et al, 2002**). De hecho, se observó que los componentes celulares GO relacionados con filopodios y lamelipodios estaban sobreexpresados en CS. La migración ameboides requiere de la señalización a través de la vía Rho-ROCK (Rho-associated serine-threonine protein kinase) que regula la contractilidad celular (**Hashimoto Y et al, 2005**). Se requieren las actividades reguladas tanto de RAC como de CDC42 para la organización espacial adecuada de haces de *fascina 1* y lamelipodios (**Kureishy N et al, 2002**), por lo que no es de extrañar que las funciones *RAC3* y *CDC42* estén sobreexpresadas en CS y CC, respectivamente. Varios artículos han demostrado en diferentes tejidos epiteliales que *Fascina1* está ausente en el epitelio normal pero presente en tumores con el mismo origen tisular, correlacionándose con la agresividad del tumor (**Hashimoto Y et al,**

2005). En este sentido, nuestros resultados coinciden con los de Qualtrough y colaboradores, quienes observaron un incremento de la motilidad celular en líneas celulares de adenoma colorrectal después de la transfección con fascina (Qualtrough et al, 2009) y con resultados previos que muestran que los CS tienen un frente activo más invasivo con reconocidas manifestaciones histológicas de TEM, como gemación tumoral y pseudofragmentos citoplasmáticos (García-Solano J et al, 2011), y con menos expresión del marcador epitelial de E-cadherina y un incremento del marcador estromal laminina 5y2 (García-Solano J et al, 2012a). Los tumores de mama también muestran una sobreexpresión / sobrerregulación de fascina y otras proteínas involucradas en el remodelado de la matriz extracelular, invasión y TEM como laminina, que, junto con la reducción de E-cadherina, confirman el fenotipo “basal-like”, caracterizado por un pronóstico adverso (Sarrió D et al, 2008). Se observa que la expresión de fascina está asociada con menor supervivencia, como ha sido descrito previamente en CCR (Hashimoto Y et al, 2006) confirmando observaciones anteriores que demuestran que CS tiene un comportamiento más agresivo que el CC (García-Solano J et al, 2010). La migrastatina, un producto natural aislado originalmente de *Streptomyces* sp. MK929-43F1 y más tarde de *Streptomyces platensis*, actúa como un inhibidor de la migración de células tumorales (Majchrzak K et al, 2013). Se ha observado que los análogos de la migrastatina, como la macrocetona muestran inhibición de la migración de células metastásicas tumorales, invasión y metástasis mediante el bloqueo de la fascina (Chen L et al, 2010), lo cual sugiere que los análogos de la migrastatina podrían constituir un tratamiento específico para el CS.

La hipocalcina es una proteína sensora de calcio de la familia recoverina (Kobayashi M et al, 1993), que cuando incrementan los niveles intracitoplasmáticos de

calcio, es miristoilada y translocada a membranas lipídicas (**Kobayashi M et al, 1993; Callaghan DW et al, 2003**). Entre sus funciones, parece proteger contra la muerte celular inducida por calcio en neuronas (**Mercer EA et al, 2000**). La evasión de la apoptosis es una de las características tempranas vistas en los CS y se ha sugerido como la causa de su morfología serrada en la que el epitelio transformado prolifera lateralmente adoptando un patrón en diente de sierra (**Hamilton SR et al, 2010; Mäkinen MJ, 2007**). Consecuentemente, no sorprende que hayamos observado que hipocalcina esté más expresada en los CS que en CC. A pesar del hecho que la expresión aberrante de los miembros de la recoverina ha sido descrita en células tumorales (**Miyagawa Y et al, 2003**), no hay estudios previos que describan la presencia de la hipocalcina en el CCR. Aunque la expresión de hipocalcina en CCR es pequeña a nivel de ARNm, se ha demostrado con tres técnicas y lo que es más, se han encontrado funciones diferencialmente expresadas en CS relacionado con la hipocalcina como son la apoptosis, la regulación del calcio y la morfogénesis neuronal. Ya que la actividad antiapoptótica de la hipocalcina parece ser ejercida a través de su interacción con NAIP (**Mercer EA et al, 2000**), en el estudio de la expresión de NAIP en las muestras de CCR encontramos que la hipocalcina y NAIP están fuertemente correlacionadas apoyando así la hipótesis de que la hipocalcina puede tener un papel en el desarrollo de CS. Hemos observado que, además de la hipocalcina, diferentes genes relacionados con el regulación neuronal están sobreexpresados en CS como *INSM1* (insulinoma asociado 1), un marcador sensible para la diferenciación de tumores de pulmón (**Lan MS and Breslin MB, 2009**). De forma similar, el transcrito THC2539939 está sobreexpresado en metástasis y no en tumores primarios neuroendocrinos gastroenterohepáticos (**Posorski N et al, 2011**).

Se ha evaluado la expresión de Fascina1 y Hipocalcina. La positividad para la expresión de Fascina1 se observó en el 88.6% de los CSs y en un 14.3% de los CCs (88.6% sensibilidad, 85.7% especificidad). Es importante destacar que la positividad de Fascina1 o Hipocalcina incrementa la sensibilidad a un 100%, indicando que cuando ambos marcadores son negativos es altamente improbable que el tumor sea un CS. Al comparar CS con hMSI-H se obtuvieron resultados similares, obteniendo una sensibilidad del 100% para la positividad de Fascina1 o Hipocalcina y una especificidad alta (80%) al combinar ambos marcadores.

Es importante señalar que la identificación de marcadores fiables es útil no solo para el diagnóstico de los CSs sino también para tratar de averiguar cuáles son las lesiones precursoras de este tumor, por lo que la evaluación de estos marcadores en pólipos serrados es una interesante línea de investigación a tener en cuenta. Los datos de funciones y genes diferencialmente expresados muestran que los CSs, a diferencia de CCs, tienen un perfil característico de reordenamiento del citoesqueleto el cual podría ser responsable de sus propiedades de adhesión celular e invasividad. La motilidad celular está íntimamente ligada a las funciones del citoesqueleto de actomiosina e implica la regulación interactiva y cíclica de los aspectos clave de la función del citoesqueleto (**Kim TY et al, 2009**). La familia de pequeñas GTPasas Rho son reguladores clave de las vías de señalización que regulan la organización de la actina y la migración celular (**Cavallaro U and Christofori G, 2004; Hobbs GA et al, 2014**). La familia Rho comprende 20 miembros, divididos en ocho subfamilias y distribuidos en cuatro grupos, a partir de su homología estructural y/o funcional: el grupo 1 con los subgrupos Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3) y RhoF (RhoD, RhoF), el grupo 2 Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG), Cdc42 (Cdc42, RhoJ, RhoQ) y RhoUV

(RhoU, RhoV); el grupo 3 RhoH y el grupo 4 RhoBTB (RhoBTB1 y RhoBTB2) (**Boureaux A et al, 2007**). Las Rho GTPasas han sido implicadas en muchos procesos celulares, incluyendo la reorganización del citoesqueleto de actina, el tráfico de vesículas, la progresión del ciclo celular, la exocitosis, la mitogénesis, y la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos extracelulares (**Rathinam R et al, 2011; Gao L et al 2013**). Otra función identificada para la Rho-GTPasas es la regulación de expresión de factores de transcripción, particularmente c-fos y c-jun. La Familia Rho también está involucrada en el control de la progresión del ciclo celular a través de la fase G<sub>1</sub> (**Hakem A et al, 2005**). Todas las proteínas GTPasas existen en dos formas interconvertibles, una forma activa con GTP (guanosintrifosfato) unido, que modula la actividad de proteínas diana específicas y una forma inactiva con GDP (guanosindifosfato) unido (**Hobbs GA et al, 2014**). El intercambio entre los dos estados se regula por factores de cambio de nucleótidos de guanina (GEFs), proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) y por proteínas inhibidoras de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs). Su actividad se incrementa por las GEFs, que promueven la liberación de GDP unido y consecuentemente, la unión de más GTP, y la disminución de las GAPs, que estimulan la hidrólisis de GTP. Las proteínas GDIs regulan la actividad de las Rho GTPasas, inhibiendo la asociación con el nucleótido de guanina, previniendo así su activación (**Biro M et al, 2014**). Las RhoGDIs pueden unirse tanto a las formas cargadas con GTP como con GDP. Las proteínas Rho también pueden regularse post-translacionalmente modificando el carboxilo terminal con la adición de un grupo lipídico por prenilación (farnesilación o geranil geranilación) o palmitoilación, mejorando de este modo su interacción con las membranas (**Vega FM and Ridley AJ, 2008; Hobbs GA et al 2014**). Uno de los efectores mejor caracterizados de Rho es ROCK, que se activa cuando se une selectivamente a la forma

activa de Rho unido a GTP. ROCK activado interactúa con el citoesqueleto de actina y promueve fibras de estrés y el ensamblaje de adhesiones focales (**Kamai T et al, 2003**). Las Proteínas Rho se encuentran raramente mutadas en tumores, mientras que su expresión y/o actividad se altera con frecuencia (**Vega FM and Ridley AJ, 2008**). Entre las funciones diferencialmente expresadas entre CS y CC destaca un perfil característico de reorganización del citoesqueleto que podría ser responsable de la especial adhesión celular y propiedades invasivas del CS. Por esta razón se decidió estudiar si GTPasas que participan en la reestructuración del citoesqueleto como RHOA, RHOC, RHOV, CDC42 y RAC3 podrían estar diferencialmente expresadas.

La activación de RHOA promueve la agrupación de filamentos de actina (fibras de estrés) y la formación de adhesiones focales (**Kim TY et al, 2009**) y es importante tanto para la migración ameboides como para la migración mesenquimal (**Vega FM and Ridley AJ, 2008**). A diferencia de algunas publicaciones donde se observa una expresión de RhoA alta en distintos tipos de cáncer como de hígado, piel, colon, ovario y testículo (**Rathinam R et al, 2011; Faried A et al, 2007; Horiuchi A et al, 2003**) y que esta se correlaciona con un mal pronóstico (**Gest C et al, 2013; Rathinam R et al, 2011**), nosotros observamos una mayor expresión de *RHOA* en muestras CC y CS de tejido normal al compararlas con sus respectivos tumorales .

RHOC podría regular la organización de microfilamentos en el polo apical de las células epiteliales intestinales (**Suwa H et al, 1998**). La inactivación de *RHOC* no afecta a la embriogénesis, función de células normales o a la respuesta inmune siendo prescindible para la iniciación del tumor, pero requiriéndose para la metástasis (**Hakem A et al, 2005**). RhoC se sobreexpresa en la línea celular de cáncer de mama SUM 149 y

la inhibición transitoria de RHOC reduce la invasión y la motilidad *in vitro*, mientras que la sobreexpresión de RHOC en células epiteliales mamarias produce un aumento significativo en la migración celular (**Baughner PJ et al, 2005**), estando asociada su expresión al aumento de invasión en melanoma, cáncer de mama, páncreas, colon, vejiga, hepatocelular, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, y tumores primarios o líneas celulares de cáncer gástrico (**Simpson KJ et al, 2004**) y a un aumento de la expresión de factores angiogénicos (**Kamai T et al, 2003**). Sin embargo, a diferencia de este potencial agresivo para RHOC visto por otros grupos, nosotros observamos mayor expresión en las muestras normales adyacentes a CC y CS, al compararlas con el tejido tumoral.

La expresión y/o actividad de ambas proteínas RHOA y RHOC se encuentra frecuentemente incrementada en tumores humanos (**Vega FM and Ridley AJ, 2008**). Así, otros estudios observaron, empleando ARN interferente retroviral en células de carcinoma de mama invasivo (células SUM-159), una relación de compensación entre RHOA y RHOC a nivel tanto de su expresión como su activación, de manera que RHOA impide la migración y la invasión de células de carcinoma de mama, mientras que RHOC la estimula y hay una relación recíproca entre RHOA y la activación de RAC1 (**Simpson KJ et al, 2004**). De este modo, en ausencia de expresión de RHOA, se observa un incremento significativo en RAC1 (**Vial E et al, 2003**). Esta relación inversa entre RHOA y RHOC también fue observada en líneas celulares de carcinoma de colon (LIM 1863) donde el aumento de la expresión de RHOC se producía simultáneamente a la disminución de la actividad de RHOA (**Bellovin DI et al, 2006**). Esta relación recíproca entre las GTPasas podría explicar la pérdida de expresión de *RHOC* que observamos en los CS tumorales respecto al tejido normal y el aumento significativo de

*RAC3*. La pérdida de correlación entre GTPasas que se observa en muestras tumorales podría indicar que se encuentran reguladas entre ellas y que la pérdida de la compensación de *RHOC* con *RHOA* (en muestras CCt) o *RHOC* con *RAC3* (en muestras CSt) podría contribuir al desarrollo del tumor.

La activación de CDC42 controla la polaridad celular y la extensión de microhaces y filopodios de actina (**Kim TY et al, 2009**) y contribuye a la homeostasis de la matriz extracelular y la integridad del tejido conectivo (**Deroanne CF et al, 2005**). CDC42 está involucrado en el establecimiento de la polaridad epitelial normal, así como la polaridad migratoria a través de su interacción con el complejo de polaridad Par3/Par6/ aPKC, que a su vez se regula a través de Rac Tiam1 (**Braga VM and Yap AS, 2005**). CDC42 es también responsable de la polarización celular y la reorientación del aparato de Golgi hacia el borde delantero durante la migración celular (**Gao L et al, 2013**). Recientemente, la evidencia acumulada ha destacado las importantes funciones de CDC42 en el desarrollo y progresión del cáncer, siendo elevada su expresión en una serie de neoplasias tales como el cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón y testículo. Su activación inducida por leptina promueve la formación de lamelipodios incrementando la invasión en células de cáncer de colon humano (**Gao L et al, 2013**). Sin embargo, otros estudios sugieren que la contribución de CD42 a la progresión del cáncer puede ser específica de tejido, ya que está regulada positivamente en algunos cánceres de mama, mientras que un estudio en ratones indica que la pérdida de CDC42 aumenta el desarrollo del cáncer de hígado (**Vega FM and Ridley AJ, 2008**). Esto podría reflejar las múltiples funciones de CD42 en la regulación de la polaridad celular y la progresión del ciclo celular. En nuestro estudio, se observa una pérdida de expresión significativa de *CDC42* en las muestras tumorales (tanto CC y CS) siendo

este efecto más acusado en CS y sugiriendo así que *CDC42* puede estar implicado en el desarrollo de un tumor más agresivo como es el CS. No obstante, otros estudios en líneas celulares de cáncer de mama no encontraron activado *CDC42* en ninguno de los tipos celulares incluyendo los más agresivos sugiriendo que *CDC42* y *RAC* podrían tener acciones redundantes en cuanto a la motilidad celular. Así por ejemplo, tanto *RAC* como *CDC42* pueden activar *Arp2/3* y producir la polimerización de la actina, pero mientras *CDC42* lo hace a través de *WASP*, *RAC* activa *Arp2/3* a través de *WAVE* (Baugher PJ et al, 2005). Esta hipótesis podría explicar por qué la expresión de *CDC42* en CC es mayor que en CS y CCR hMSI-H; mientras que estos últimos tienen un nivel de expresión elevada para *RAC3*.

*RHOA/WRCH1* y *RHOV/WRCH2* tienen un dominio N-terminal rico en prolina que no está presente en otros miembros de la familia de las proteínas Rho y que puede unirse a dominio SH3 presente en proteínas como *Nck2* y *Grb2* (Aspenström P et al, 2007). La sobreexpresión de *RHOA* y *RHOV* induce la reorganización del citoesqueleto de actina, incluyendo la formación de filopodios y disolución de las fibras de estrés (Ridley AJ et al, 2006). La expresión aumentada de *RHOV* de la comparación de todas las muestras tumorales (CC y CS) con muestras de tejido normal ha sido observada por otros grupos en líneas celulares de cáncer, encontrándose sobreexpresada en algunos cánceres humanos (Aronheim A et al, 1998). Nuestros resultados respaldarían un posible papel de *RHOV* en la progresión del cáncer.

La familia *RAC* incluye *RAC1*, *RAC2* y *RAC3*. *RAC3* difiere de *RAC1* y *RAC2* en dos dominios, la región de inserción y la región C terminal, un dominio asociado a localización subcelular que influye en la unión de reguladores celulares

específicos (**Haataja L et al, 1997**). La activación de RAC conduce a la polimerización de la actina y la formación lamelipodios, que a su vez permite la creación de adhesiones focales. La formación de adhesiones focales puede activar RAC, creando un bucle de retroalimentación positiva que, cuando se desregula, puede conducir a un aumento de la motilidad y la invasión (**Baughner PJ et al, 2005**). Se ha demostrado que RAC, junto con RHO y CDC42, se requiere para la progresión de las células de G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular, pudiendo permitir a las células tumorales proliferar en condiciones anormales (**Olson MF et al, 1995**). RAC3 se encuentra expresado en el cerebro pero también se expresa en una amplia gama de tejidos. En concordancia con otras investigaciones que muestran como la activación de RAC3 está involucrada en un fenotipo invasivo y metastásico de células de cáncer de mama (**Mira JP et al, 1999; Gest C et al, 2013**), próstata (**Engers R et al, 2007**) pulmón (**Liu TQ et al, 2015**) y de glioma (**Chan AY et al, 2005**), observamos en nuestro trabajo una mayor expresión de *RAC3* en tejido CS frente a tejido normal. Además observamos, al comparar CC con CS, una expresión mayor y significativa de *RAC3* en CS que podría contribuir a la progresión del tumor, como se ha visto en otros tipos de cánceres, donde el aumento de la actividad de RAC1 o RAC3 produce un aumento de la adhesión, migración e invasión (**Baughner PJ et al, 2005**). Esta mayor expresión de *RAC3* en CS podría ser debido a una pérdida de su regulación debido a la disminución de otras GTPasas; circunstancias estas que podrían contribuir a un fenotipo más agresivo de los CS (**Wang Z et al, 2010**).

Por otro lado, se ha visto que RAC3 disminuye la respuesta celular a la apoptosis en líneas celulares invasivas de cáncer de mama (MDA-MB-231) mientras que en líneas celulares de cáncer de mama no agresivas (MCF-7) tiene un mínimo

efecto probablemente debido al estado inactivo de las proteínas NF-kappa B en estas células (Gest C, et al 2013). En nuestro estudio observamos que el CCR hMSI-H presenta una mayor respuesta inmune comparado con el CS y una mayor expresión de *RAC3* con respecto al CS y con CC. Este hallazgo concuerda con otros trabajos que sugieren que el incremento de *RAC3* durante la respuesta inflamatoria podría ser un mecanismo molecular relacionado con el control de la sensibilidad, tanto frente al estímulo proinflamatorio como antiinflamatorio, con el objetivo de matener una respuesta normal y apropiada del sistema inmunológico (Alvarado CV et al, 2014). *RAC3* podría incrementarse por la respuesta inflamatoria y a su vez favorecer el desarrollo tumoral, por lo que la sobreexpresión de *RAC3* podría tener un papel importante en la proliferación de este tipo de tumores que presentan una mayor respuesta inmune. Además, se observa una correlación entre *RAC3* con *RHOA* y *CDC42* en las muestras tumorales de hMSI-H, y una correlación entre *RHOA* y *RAC3* en los casos tumorales de CS. Todos estos datos sugieren que en la expresión de las GTPasas hay una regulación recíproca. No encontramos diferencias en cuanto a la expresión de las GTPasas al comparar las distintas muestras de tejido normal. Sin embargo, a diferencia de otros grupos, encontramos mayor expresión de *RHOA*, *RHOC* y *CDC42* en tejido normal CC y CS frente a sus correspondientes tumorales. En muestras normales adyacentes al tumor parece haber una ligera correlación, entre las GTPasa *RHOA* con *RHOC*, *CDC42* y *RHOV* que se pierde cuando se trata de muestras tumorales. La pérdida de esta regulación en muestras tumorales y desarrollo de nuevas correlaciones que implican a *RAC3* podría indicar que la pérdida de una GTPasa puede ser compensada con otra, y que el aumento de *RAC3* pueda tener una destacada participación en la progresión tumoral.

Los CCRs esporádicos con criterios histológicos y moleculares de alta inestabilidad de microsatélites suponen el 75% de los CCR con MSI. Tanto CS como el CCR hMSI-H han sido propuestos como punto final de la vía del pólipo serrado, pero hasta la fecha, no hay estudios de perfiles moleculares que valoren las posibles funciones y genes diferenciales en estos dos subtipos histológicos de CCR.

De la comparación de los perfiles moleculares entre las muestras CS y CCR hMSI-H destacamos la mayor expresión en CCR hMSI-H de funciones relacionadas con el sistema inmune. Con el fin de analizar diferencias en el comportamiento inmunológico de estos dos subtipos de CCR se estudiaron genes que participaban en procesos inmunológicos. Basado en criterios de significación y disponibilidad de anticuerpos, se seleccionaron *ICAM-1* y *CSF3R*, entre los genes sobreexpresados en CCR hMSI-H y *CXCL14* y *CRCP* entre los sobreexpresados en CS.

ICAM-1, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, es una glicoproteína de superficie celular con expresión en las células endoteliales vasculares, tejido linfoide periférico, y algunas células de parénquima. ICAM-1 modula la adhesión célula-célula y célula-matriz y su papel en la inflamación ha sido bien estudiado (**Roland CL et al, 2007**). Es una molécula coestimuladora que proporciona señal a los linfocitos T citotóxicos (CTL) y a las células natural killer (NK) mediando la adhesión celular a través del receptor antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1). La adhesión intercelular mediada por ICAM-1/ LFA-1 juega un papel clave en la unión de las linfocitos T citotóxicos y células NK a las células tumorales, lo cual estimula la activación inmune (**Tachimori A et al, 2005**). ICAM-1 se cree que juega un importante papel en diversas neoplasias. Se observó una posible participación de ICAM-1 en la

invasión y metástasis del cáncer en melanomas, cánceres de páncreas, pulmón y orales. Por el contrario, en cánceres de mama, estómago, y colorrectales, el aumento de la expresión de ICAM-1 en células cancerosas se correlaciona con un pronóstico más favorable, lo que sugiere un papel de ICAM-1 en la mejora de la vigilancia inmune (**Lin CW et al, 2013**). Estos descubrimientos concuerdan con la mayor expresión de *ICAM-1* que encontramos en CCR hMSI-H, tanto a nivel de expresión génica por microarrays, como por qPCR ( $p= 0,0183$ ) y por inmunohistoquímica. De la comparación entre muestras de tejido normal y tumoral hMSI-H por qPCR, se observa un aumento en la expresión de *ICAM-1* para CCR hMSI-H que no se evidencia al comparar entre muestras CS normal y CS tumoral. Estos resultados sugieren un importante papel de *ICAM-1* en la respuesta inmune de los tumores hMSI-H y podría parcialmente explicar por qué los CSs parecen ser menos reconocidos por el sistema inmune. Con estas observaciones se sugiere que los pacientes con CS podrían beneficiarse del tratamiento con fármacos estimuladores del sistema inmune. Estos fármacos actúan bloqueando señales inhibitorias de las células T potenciando así la respuesta inmune antitumoral como son los anticuerpos monoclonales ipilimumab, que bloquea antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y pembrolizumab y nivolumab contra la proteína de muerte programada 1 (PD-1) aprobados para el tratamiento del melanoma avanzado metastásico (**Pardoll DM 2012; Faghfuri E et al 2015**)

Tachimori y colaboradores observaron que la disminución de ICAM-1 en células cancerosas está asociada a metástasis hepáticas en el cáncer colorrectal. Posteriormente, informaron que la incidencia de metástasis en cáncer de mama, gástrico y colon es significativamente menor en pacientes con tumores ICAM-1-positivos que en los tumores ICAM-1-negativos, y el pronóstico de pacientes con tumores de ICAM-1-

negativo es significativamente peor. Estos resultados indican que la expresión de ICAM-1 en células de cáncer podría desempeñar un papel importante en la metástasis del cáncer, ya que la pérdida o disminución de la expresión de ICAM-1 en las células cancerosas podría ser responsable de la fuga de células cancerosas de la vigilancia inmunológica. Las células cancerosas sin expresión de ICAM-1 pueden crecer sin reconocimiento y evitar la lisis celular por CTL y células NK, y pueden sobrevivir a la metástasis. Tal deterioro de la vigilancia inmune puede contribuir a la metástasis de hígado y a un peor pronóstico clínico (**Tachimori A et al, 2005**). Estas conclusiones concuerdan con el comportamiento más agresivo de los CS frente a los CCR hMSI-H. La terapia inmunogénica se ha utilizado para diversos tipos de cánceres con células efectoras, incluyendo macrófagos, CTL y células NK. La transfección génica de *ICAM-1* usando como vector adenovirus podría ser una terapia efectiva para pacientes con metástasis hepática por carcinoma colorrectal (**Tachimori A et al, 2005**).

G-CSF fue identificado por primera vez como un estimulador de granulocitos y regulador de la proliferación, la maduración y la supervivencia de los granulocitos, macrófagos y células precursoras hematopoyéticas (**Wang J et al, 2012**). Además se ha descrito su expresión por fibroblastos, células endoteliales, y queratinocitos (**Obermueller E et al, 2004**). En células normales la expresión de G-CSF está estrictamente regulada, requiriendo la inducción por estímulos apropiados tales como interleucina-1, factor de necrosis tumoral o lipopolisacáridos (**Gutschalk C M et al, 2006**). La epidemiología clínica apoya cada vez más la existencia de respuestas inmunitarias antitumorales en algunas formas de cáncer humano, como por ejemplo, los pacientes con tumores de colon y ovario fuertemente infiltrados con CTL y células NK tienen un mejor pronóstico que los que carecen de ellos (**Hanahan D and Weinberg**

**RA, 2011).** Los CCR MSI presentan infiltrado linfoide peritumoral y frecuentes linfocitos intratumorales (**Jenkins MA et al, 2007**). El hecho de que la mayor expresión de *CSF3R* en CCR hMSI-H observada por microarrays y que la expresión constitutiva de G-CSF se asocie con leucocitosis y una mejor supervivencia de neutrófilos (**Obermueller E et al, 2004**), podría implicar a este receptor en la contribución a la mayor expresión de leucocitos observada en los CCR hMSI-H. Por otro lado, se ha sugerido que G-CSF contribuye a la progresión del tumor de una manera paracrina por participar en la activación del estroma tumoral y potenciar la angiogénesis y la infiltración de células inflamatorias (**Gutschalk C M et al, 2006; Obermueller E et al, 2004**) y que un inductor de la proliferación celular endotelial y la migración *in vitro* actúa como estimulador de la angiogénesis *in vivo* (**Obermueller E et al, 2004; Gutschalk CM et al, 2006; Schweizerhof M et al, 2009**). Otros estudios sugieren que G-CSF podría acelerar la progresión del tumor por regulación directa la expresión COX-2 (**Uemura Y et al, 2006**). Es conocido el papel de G-CSF en la inducción de la proliferación de algunos tipos de células través de la estimulación de la señalización de G-CSFR (**Morris K T et al, 2014**). Se ha visto que G-CSFR se expresa tanto en granulocitos neutrófilos como en células tumorales no hematopoyéticas (**Noda I et al, 1999**). Varios estudios señalan que la función más probable de la señal a través de G-CSFR puede ser el aumento de la invasividad de las células cancerosas (**Noda I et al, 1999; Yang X et al, 2005, Gutschalk CM et al, 2006; Schweizerhof M et al, 2009; Wang J et al, 2012; Morris K T et al, 2014; Yang XD et al, 2014**). Los resultados por qPCR no mostraron diferencias significativas en la expresión de *CSF3R*, por lo que no fue seleccionado para realizar el estudio de su expresión por inmunohistoquímica. Así, el papel de *CSF3R* como barrera en la progresión de tumores CCR hMSI-H no está clara.

CXCL14, también conocida como BRAK (quimiocina de mama y riñón) por ser identificada inicialmente en estos tejidos, se expresa en células normales y su expresión está ausente o disminuida en ciertos tejidos tumorales los de células escamosas de cabeza y cuello y algunos carcinomas cervicales de células escamosas (**Frederick MJ et al, 2000**), cáncer de próstata y cáncer pancreático (**Wang W et al, 2013**). Incluso se ha otorgado a *CXCL14* la función como supresor tumoral en el carcinoma hepatocelular (**Wang W et al, 2013**). Sin embargo, aunque el papel de *CXCL14* como supresor tumoral parece bien establecido (**Ozawa S et al, 2009**), ciertos estudios recientes sugieren que puede actuar como promotor de la progresión tumoral. *In vivo*, la expresión del ARNm de *CXCL14* está incrementada en células inflamatorias en el microambiente de una variedad de neoplasias malignas sólidas (**Cao B et al, 2013**). Los resultados de la expresión por microarrays mostraron una expresión de *CXCL14* significativamente mayor para los CS frente a los hMSI-H, por lo que podría promover la transformación celular y la progresión del tumor (**Zeng J et al, 2013**).

Se ha observado un aumento de CXCL14 en tejidos de cáncer pancreático en comparación con el páncreas normal y pancreatitis crónica, aumentando significativamente la invasividad de las células de cáncer de páncreas (**Wente MN et al, 2007**). Se ha visto que CXCL14 se sobreexpresa en células tumorales mioepiteliales, y se une a receptores en las células epiteliales mejorando su proliferación, migración e invasión. Por lo tanto, las quimioquinas pueden jugar un papel en la tumorigénesis al actuar como factores paracrinos (**Allinen M et al, 2004; Zeng J et al, 2013**). También se ha documentado que la transcripción de CXCL14 es marcadamente superior en el carcinoma papilar de tiroides que en los tejidos no cancerosos adyacentes y se encuentra correlacionado positivamente con metástasis de los ganglios linfáticos (**Zeng J et al,**

2013). Las mutaciones en BRAF inducen la expresión de CXCL14 en el carcinoma papilar de tiroides (Oler G et al, 2008). CXCL14 puede actuar como un estimulador multi-modal del crecimiento del tumor de próstata y estómago (Zeng J et al, 2013). CXCL14 se encuentra aumentado con frecuencia en CCR en comparación con el tejido adyacente de mucosa normal colorrectal y la expresión elevada CXCL14 en los CCR primarios se asocia a peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, lo que indica que CXCL14 podría ser utilizado como un potencial marcador pronóstico para pacientes con CCR (Zeng J et al, 2013). Este hallazgo es coherente con estudios anteriores en los que la expresión de CXCL14 estaba elevada en los tejidos tumorales en comparación con el tejido normal adyacente (Wente MN et al, 2008; Allinen M et al, 2004; Cao B et al, 2013). Con todo esto, y los resultados de la mayor expresión de CXCL14 en CS, parece que podría participar en el desarrollo tumoral aunque los resultados por qPCR e inmunohistoquímica solo mostraron una ligera mayor expresión en CS, por lo que no podemos proponer a esta quimiocina como marcador distintivo de los CS frente a los hMSI-H.

CRCP está presente en dos isoformas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y se expresa en el sistema nervioso central y periférico presentándose en hasta el 80% de las terminales nerviosas que contienen la sustancia P como neuropéptido. Ambas isoformas están involucrados en la regulación de diversos efectos fisiológicos como nocicepción y secreción y en la relajación del músculo liso que lleva a la dilatación arteriolar y el posterior aumento del flujo sanguíneo del tejido (Cottrell GS et al, 2012). El péptido relacionado con el gen de la adrenomedulina (AM), adrenomedulina 2 (AM2/ intermedin) y la calcitonina son miembros de la familia de péptidos calcitonina. Pueden actuar como factores de crecimiento de un número de tumores estimulando la angiogénesis y linfangiogénesis

(Hay DL et al, 2011). CRCP puede jugar un papel en la inflamación neurogénica, la remodelación de tejidos del cuello uterino, la promoción de la vasodilatación, el parto, y el procesamiento de la información sensorial en la médula espinal (Pokabla MJ et al, 2001). CRCP modula la motilidad y la secreción dentro del sistema gastrointestinal (Cottrell GS et al, 2012). CRCP actúa directamente sobre células CD34+ promoviendo la formación de colonias granulomonocíticas (Harzenetter MD et al, 2001). Los receptores de CRCP actúan a través de la estimulación de Gs y la producción de cAMP, sin embargo, pueden ser activadas otras vías. En varios estudios se ha demostrado que CRCP aumenta la proliferación mediante la activación de los miembros de la familia de MAP quinasas y aumenta la vasodilatación a través de cGMP y la producción de NO (Hay DL et al 2011). Se ha evidenciado la expresión elevada de CRCP en plasma y tumores de cánceres específicos; incluyendo carcinomas de células pequeñas de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de tiroides (Hay DL et al 2011). CRCP se ha encontrado en el nervio prostático, predominantemente el nervio autonómico y en células prostáticas neuroendocrinas donde parece regular la secreción de proteasa e puede influir en la diferenciación celular epitelial. Además, CRCP incrementa el potencial invasivo no solo de las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3, sino también de las células LNCaP probablemente a través de la potenciación de la motilidad celular (Suzuki K et al, 2006). Los datos de expresión génica mostraron una mayor expresión en tejido CSt frente a hMSI-H, que se confirmó por qPCR. Los resultados por inmunohistoquímica respaldan la mayor expresión en CS, pero sin resultados estadísticamente significativos. Así, se ha observado una asociación entre el nivel de CRCP y la agresividad del tumor (Suzuki K et al, 2006). Otros grupos también obtuvieron resultados tanto *in vivo* como *in vitro* que apoyan la participación de CRCP en el desarrollo tumoral. *In vivo*, la infusión de CRCP aumentó el volumen del tumor

implantado. Además, en un modelo de extremidad posterior de la rata, se pudo constatar que las condiciones isquémicas aumentaron el contenido de CRCP y su sobreexpresión potencia la angiogénesis. CRCP puede aumentar la proliferación celular *in vitro*, la formación del tubo celular endotelial y la migración e invasión de las células derivadas de cáncer de próstata mediante la mejora de la movilidad celular y la migración haptotáctica a la fibronectina (Hay DL et al, 2011). Con todo esto, podemos destacar la posible contribución de *CRCP* en la progresión de los tumores CS.



## **VI. CONCLUSIONES**





## VI. CONCLUSIONES

1.- El análisis de la expresión génica mediante microarrays demuestra que, comparado con el CC, el CS se caracteriza por la expresión diferencial de determinadas funciones relacionadas con el citoesqueleto y la apoptosis que podrían explicar los hallazgos clinicopatológicos observados con el CS como su peor supervivencia asociada, su mayor invasividad y su patrón de crecimiento serrado.

2.- El estudio de perfiles de expresión ha permitido identificar y validar a Fascina1 e Hipocalcina como marcadores diagnósticos útiles del CS que, por su función parecen desempeñar un papel causal en el desarrollo del fenotipo invasor y de la evasión de la apoptosis.

3.- La desregulación en la función de las GTPasas parece relacionarse significativamente con el desarrollo del CCR de forma general y comportarse de forma distinta concretamente en el CS con respecto al CC, observándose la expresión de *CDC42* aumentada en los CC y la de *RAC3* en los CS.

4.- El análisis de la expresión génica mediante microarrays demuestra que, comparado con el CCR hMSI-H, el CS se caracteriza por la expresión diferencial de determinadas funciones relacionadas con la respuesta inmunológica que podrían explicar los hallazgos clinicopatológicos observados para el CS en cuanto a su capacidad para evitar el sistema inmune.

5.- La expresión de *ICAMI* en hMSI-H tumoral fue cinco veces mayor que en CSs, indicando que podría estar implicada en una mejor respuesta inmune en los CCR hMSI-H esporádicos, mientras que para *CRCP* y *CXCL14* existe una mayor expresión en CSs tumoral coincidiendo con los resultados del microarray; aunque esta asociación se observa a nivel de tendencia.

6.- A pesar de que la expresión de *RAC3* es mayor en CCR hMSI-H que en los CS, también presentan una mayor expresión de *RHOA* y *RHOC* y estas podrían frenar la contribución de *RAC3* a una mayor agresividad.

7.- La mayor expresión de *FSCN1* y la menor expresión de *ICAMI* observada en los CSs puede estar relacionada con la mayor capacidad de invasión y la menor respuesta inmune demostrada para este tipo de tumor en estudios previos.

8.- El CS presenta una clara desregulación de mecanismos que participan en la reorganización del citoesqueleto y una evasión de la respuesta inmune que favorecen el desarrollo y la agresividad de este tipo de tumores, siendo estas funciones potencialmente tratables mediante tratamientos farmacológicos.

## VII. BIBLIOGRAFÍA





## VII. BIBLIOGRAFÍA

Adams, J.C. Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004; 16: 590-596.

Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol.* 2001 Feb;158(2):527-35.

Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2012; 27: 1423-1431.

Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 2004 Jul;6(1):17-32.

Alvarado CV, Rubio MF, Fernández Larrosa PN, Pabelo LC, Azurmendi PJ, Ruiz Grecco M, et al. The levels of RAC3 expression are up regulated by TNF in the inflammatory response. *FEBS Open Bio.* 2014 May 2;4:450-7.

Arévalo F, Aragón V, Alva J, PérezNarrea M, Cerrillo G, Montes P, et al. Colorectal polyps: update on diagnosis. *Rev Gastroenterol Peru.* 2012; 32 (2):123-33.

Aronheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, Belisle B, Abo A. Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol.* 1998 Oct 8;8(20):1125-8.

Aspenström P, Ruusala A, Pacholsky D. Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res.* 2007 Oct 15;313(17):3673-9.

Barker N. The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Methods Mol Biol.* 2008;468:5-15.

Baughner PJ, Krishnamoorthy L, Price JE, Dharmawardhane SF. Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):R965-74.

Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, Maynard E, Rimm DL, Oettgen P, et al. Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene.* 2006 Nov 2;25(52):6959-67.

Bengoechea O, Martinez-Penuela JM, Larringa B, Valerdi J, Borda F. Hyperplastic polyposis of the colorectum and adenocarcinoma in a 24-year-old man. *Am J Surg Pathol.* 1987 Apr;11(4):323-7.

Berthelet J, Dubrez L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells.* 2013 Mar 14;2(1):163-87

Biro M, Munoz MA, Weninger W. Targeting Rho-GTPases in immune cell migration and inflammation. *Br J Pharmacol*. 2014 Dec;171(24):5491-506.

Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2073-2087.e3.

Boparai KS, Dekker E, Van Eeden S, Polak MM, Bartelsman JF, Mathus-Vliegen EM et al. Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology*. 2008 Dec;135(6):2014-8.

Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 2007 Jan;24(1):203-16.

Callaghan DW, Tepikin AV, Burgoyne RD. Dynamics and calcium sensitivity of the Ca<sup>2+</sup>/myristoyl switch protein hippocalcin in living cells. *J Cell Biol* 2003;163:715–21.

Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res*. 2004 Nov 1;64(21):7678-81.

Cao B, Yang Y, Pan Y, Jia Y, Brock MV, Herman JG, et al. Epigenetic silencing of CXCL14 induced colorectal cancer migration and invasion. *Discov Med*. 2013 Oct;16(88):137-47.

Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*. 2011 Mar;2(3):261-74.

Catalán V, Honorato B, García F, Bandrés E, Zabalegui N, Zárata R, et al. Carcinogénesis colónica: proceso de transformación neoplásica. *Rev. Méd. Uni. Navarra* 2003; 47 (1); 15-19.

Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:118–32.

Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, Michaelson D, Knaus UG, Philips MR, et al. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene*. 2005 Nov 24;24(53):7821-9.

Chang DZ, Kumar V, Ma Y, Li K, Kopetz S. Individualized therapies in colorectal cancer: KRAS as a marker for response to EGFR-targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2009 Apr 22;2:18.

Chen L, Yang S, Jakoncic J, Zhang JJ, Huang XY. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature* 2010;464:1062–6.

Chow E, Lipton L, Lynch E, D'Souza R, Aragona C, Hodgkin L et al. Hyperplastic polyposis syndrome: phenotypic presentations and the role of MBD4 and MYH. *Gastroenterology*. 2006 Jul;131(1):30-9.

Clark, EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000; 406: 532-535.

Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 16385-16385.

Cottrell GS, Alemi F, Kirkland JG, Grady EF, Corvera CU, Bhargava A. Localization of calcitonin receptor-like receptor (CLR) and receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) in human gastrointestinal tract. *Peptides.* 2012 Jun;35(2):202-11.

Cripps C, Gill S, Ahmed S, et al. Consensus recommendations for the use of anti-egfr therapies in metastatic colorectal cancer. *Current Oncology.* 2010;17(6):39-45.

Day FL, Jorissen RN, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2013 Jun 15;19(12):3285-96.

de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Oct;4(10):769-80.

Deroanne CF, Hamelryckx D, Ho TT, Lambert CA, Catroux P, Lapière CM, et al. Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway. *J Cell Sci.* 2005 Mar 15;118(Pt 6):1173-83.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5705-12.

Engers R, Ziegler S, Mueller M, Walter A, Willers R, Gabbert HE. Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas. *Endocr Relat Cancer.* 2007 Jun;14(2):245-56.

Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993;112:809–823.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):286-98.

Ewing I, Hurley JJ, Josephides E, Millar A. The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline Gastroenterology* 2014; 5: 26-30.

Faghfuri E, Faramarzi MA, Nikfar S, Abdollahi M. Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2015 Sep;15(9):981-93.

Falchook GS, Naing A, Wheler JJ, Tsimberidou AM, Zinner R, Hong DS et al. Dual EGFR inhibition in combination with anti-VEGF treatment in colorectal cancer. *Oncoscience.* 2014;1(8):540-549.

Faried A, Faried LS, Usman N, Kato H, Kuwano H. Clinical and prognostic significance of RhoA and RhoC gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007 Dec;14(12):3593-601.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.

Fenoglio-Preiser CM. Chapter 14. Epithelial Neoplasms of the Colon: Colonic Adenomas and Carcinomas. En: Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Isaacson Peter G. *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text*, 3rd Ed. Lippincott Williams & Wilkins: 2008.

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J GastroutestOncol* 2012; 3: 153-173.

Frederick MJ, Henderson Y, Xu X, Deavers MT, Sahin AA, Wu H, et al. In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. *Am J Pathol*. 2000 Jun;156(6):1937-50.

Gao L, Bai L, Nan Qz. Activation of Rho GTPase Cdc42 promotes adhesion and invasion in colorectal cancer cells. *Med Sci Monit Basic Res*. 2013 Jul 25;19:201-7.

García-Solano J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuela-Fuentes P et al. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2010 Oct;41(10):1359-68.

García-Solano J, Conesa-Zamora P, Trujillo-Santos J, Mäkinen MJ, Pérez-Guillermo M. Tumour budding and other prognostic pathological features at invasive margins in serrated colorectal adenocarcinoma: a comparative study with conventional carcinoma. *Histopathology*. 2011 Dec;59(6):1046-56.

García-Solano J, Conesa-Zamora P, Trujillo-Santos J, Torres-Moreno D, Mäkinen MJ, Pérez-Guillermo M. Immunohistochemical expression profile of  $\beta$ -catenin, E cadherin, P-cadherin, laminin-5 $\gamma$ 2 chain, and SMAD4 in colorectal serrated adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2012 Jul;43(7):1094-102. (a)

García-Solano J, Conesa-Zamora P, Carbonell P, Trujillo-Santos J, Torres-Moreno D, Pagán-Gómez E, et al. Colorectal serrated adenocarcinoma shows a different profile of oncogene mutations, MSI status and DNA repair protein expression compared to conventional and sporadic MSI-H. *Int J Cancer*. 2012 Oct 15;131(8):1790-9. (b)

García-Solano J, Conesa Zamora P, Pérez Guillermo M. Carcinoma colorrectal serrado: caracterización morfológica, inmunohistoquímica y molecular *Rev Esp Patol*. 2013; 46: 162–171.

Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard LL, Petit A, Dulong C, et al. . Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2013; 13:63.

Globocan.iarc.f acceso en marzo/2014

Goldstein NS, Bhanot P, Odish E, Hunter S. Hyperplasticlike colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003; 119:778–96.

Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman's Cecil Medicine*. 24th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011.

Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008; 135:1079-99.

Grasso S, Martínez-Lacaci I, Barberá VM, Castillejo A, Soto JL, Gallego-Plazas J, et al. HGUE-C-1 is an atypical and novel colorectal carcinoma cell line. *BMC Cancer* . 2015 Apr. 8;15:240.

Green RA, Wollman R, Kaplan KB. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol Biol Cell.* 2005 Oct;16(10):4609-22. Epub 2005 Jul 19.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000 Jan 13;342(2):69-77.

Gutschalk CM, Herold-Mende CC, Fusenig NE, Mueller MM. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo. *Cancer Res.* 2006 Aug 15;66(16):8026-36.

Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem.* 1997 Aug 15;272(33):20384-8.

Hakem A, Sanchez-Sweatman O, You-Ten A, Duncan G, Wakeham A, Khokha R et al. RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev.* 2005 Sep 1;19(17):1974-9.

Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura SI, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT; Carneiro F; Hruban RH and Theise ND (eds) *WHO Classification of Tumours of the digestive system*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC) 2010: 134– 146.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74

Harzenetter MD, Keller U, Beer S, Riedl C, Peschel C, Holzmann B. Regulation and function of the CGRP receptor complex in human granulopoiesis. *Exp Hematol.* 2002 Apr;30(4):306-12.

Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. Roles of fascin in human carcinoma motility and signalling: prospects for a novel biomarker. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1787–804.

Hashimoto Y, Skacel M, Lavery IC, Mukherjee AL, Casey G and Adams JC. Prognostic significance of fascin expression in advanced colorectal cancer: an immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2006;6:241.

Hay DL, Walker CS, Poyner DR. Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in endocrine-related cancers: opportunities and challenges. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Dec 13;18(1):C1-14.

Haydon AM, Jass JR. Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol*. 2002 Feb;3(2):83-8.

Hernandez-Losa J, Sanz J, Landolfi S, López-Ríos F, Palácios J, Bautista MD, et al. Recomendaciones para la determinación de mutaciones de KRAS en cáncer de colon. *Res Esp Patol*. 2012; 45 (2): 76-85.

Hibbs ML, Bonadonna L, Scott BM, McKenzie IFC, Hogarth PM. Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor. *Proc. Nat. Acad*. 1988; 85: 2240-2244.

Hirakawa M, Takimoto R, Tamura F, Yoshida M, OnoM, MuraseK, et al. Fucosylated TGF- $\beta$  receptors transduce a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer* 2014; 110: 156-163.

Hobbs GA, Zhou B, Cox AD, Campbell SL. Rho GTPases, oxidation, and cell redox control. *Small GTPases* 2014; 5:e28579.

Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaido T et al. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest*. 2003 Jun;83(6):861-70.

Huang CS, Farraye FA, Yang S, O'Brien MJ. The clinical significance of serrated polyps. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:229-40.

Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013 Sep;62(9):1315-26.

Hyman NH, Anderson P, Blasyk H. Hyperplastic polyposis and the risk of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2004 Dec;47(12):2101-4.

Ibarrola I, Vosseveld PJ, Homburg CH, Thelen M, Roos D, Verhoeven AJ. Influence of tyrosine phosphorylation on protein interaction with Fc $\gamma$ RIIa. *Biochim. Biophys*. 1997; 1357 : 348-58.

Inazawa, J, Fukunaga, R, Seto, Y, Nakagawa, H, Misawa, S, Abe, T, et al. . Assignment of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor gene (CSF3R) to chromosome 1 at region p35-p34.3. *Genomics* 1991;10: 1075-1078.

- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993 Jun 10;363(6429):558-61.
- Jang KS, Song YS, Jang SH, Min KW, Na W, Jang SM et al. Clinicopathological significance of nuclear PTEN expression in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology*. 2010 Jan;56(2):229-39.
- Jänne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:1960-1968.
- Jass JR, Iino H, Ruzkiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ et al. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut*. 2000 Jul;47(1):43-9.
- Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am*. 2002 Oct;82(5):891-904.
- Jass JR. Serrated Adenoma of the Colorectum : A Lesion with Teeth. *The American Journal of Pathology*. 2003;162(3):705-708.
- Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):113-30.
- Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology*. 2007;133:48-56.
- Jeong SY, Shin KH, Shin JH, Ku JL, Shin YK, Park SY et al. Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Dis Colon Rectum*. 2003 Aug;46(8):1069-77.
- Jeevaratnam P, Cottier DS, Browett PJ, Van De Water NS, Pokos V, Jass JR. Familial giant hyperplastic polyposis predisposing to colorectal cancer: a new hereditary bowel cancer syndrome. *J Pathol*. 1996 May;179(1):20-5.
- Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y et al. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Jul;9(7):2632-41.
- Kantola T, Klintrup K, Väyrynen JP, Vornanen J, Bloigu R, Karhu T, et al. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 2012 Nov 6;107(10):1729-36.
- Kim TY, Vigil D, Der CJ, and Juliano RL. Role of DLC-1, a Tumor Suppressor Protein with RhoGAP activity, in Regulation of the Cytoskeleton and Cell Motility. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 June ; 28(1-2): 77–83.

Kobayashi M, Takamatsu K, Saitoh S, Noguchi T. Myristoylation of hippocalcin is linked to its calcium-dependent membrane association properties. *J Biol Chem* 1993;268:18898–904.

Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- $\beta$  - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.* 2012; 10 (3): 183.

Kureishy N, Sapountzi V, Prag S, Anilkumar N, Adams JC. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays* 2002;24:350–61.

Kurth, I, Willimann K, Schaerli P, Hunziker T, Clark-Lewis I, Moser B. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 855-861.

Laiho P, Kokko A, Vanharanta S, Salovaara R, Sammalkorpi H, Järvinen H, et al. Serrated carcinomas form a subclass of colorectal cancer with distinct molecular basis. *Oncogene* 2007;26:312-20.

Lan MS, Breslin MB. Structure, expression, and biological function of INSM1 transcription factor in neuroendocrine differentiation. *FASEB J* 2009;23:2024–33.

Lazarus R, Junttila OE, Karttunen TJ, Mäkinen MJ. The risk of metachronous neoplasia in patients with serrated adenoma. *Am J Clin Pathol.* 2005 Mar;123(3):349-59.

Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2088-100.

Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med.* 2012 Oct 25;367(17):1596-606.

Lin CW, Chuang CY, Tang CH, Chang JL, Lee LM, Lee WJ, et al. Combined effects of icam-1 single-nucleotide polymorphisms and environmental carcinogens on oral cancer susceptibility and clinicopathologic development. *PLoS One.* 2013 Sep 12;8(9):e72940.

Lindor NM. Hereditary colorectal cancer: MYH-associated polyposis and other newly identified disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2009;23(1):75-87.

Liu TQ, Wang GB, Li ZJ, Tong XD, Liu HX. Silencing of rac3 inhibits proliferation and induces apoptosis of human lung cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(7):3061-5.

Loh AH, Brennan RC, Lang WH, Hickey RJ, Malkas LH, Sandoval JA. Dissecting the PI3K Signaling Axis in Pediatric Solid Tumors: Novel Targets for Clinical Integration. *Front Oncol.* 2013 23; 93 (3): 1-10.

Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps /serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 1990;14:524–37.

Mack NA, Whalley HJ, Castillo-Lluva S, Malliri A. The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle.* 2011 May 15;10(10):1571-81.

Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Hakoshima, T. The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Molec. Cell* 1999. 4: 793-803.

Mäkinen MJ, George MC, Jervall P, Mäkelä J, Vihko P, Karttunen TJ. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma-prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol* 2001;193:286-94.

Mäkinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* 2007; 50: 131–50.

Mao G, Yuan F, Absher K, Jennings CD, Howard DS, Jordan CT et al. Preferential loss of mismatch repair function in refractory and relapsed acute myeloid leukemia: potential contribution to AML progression. *Cell Res.* 2008 Feb;18(2):281-9.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 1995 Jun 2;268(5215):1336-8.

Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;361:2449-60.

Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005 Dec 1;19(23):2783-810.

McCann BG. A case of metaplastic polyposis of the colon associated with focal adenomatous change and metachronous adenocarcinomas. *Histopathology.* 1988 Dec;13(6):700-2.

Mercer EA, Korhonen L, Skoglösa Y, Olsson PA, Kukkonen JP, Lindholm D. NAIP interacts with Hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and independent pathways. *EMBO J* 2000; 19: 3597-607.

Mira JP, Benard V, Groffen J, Sanders LC, Knaus UG. Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 4;97(1):185-9.

Mitrugno A, Williams D, Kerrigan SW, Moran N. A novel and essential role for FcγRIIIa in cancer cell-induced platelet activation. *Blood.* 2014 Jan 9;123(2):249-60.

Miyagawa Y, Ohguro H, Odagiri H, Aruyama I, Maeda T, Maeda A, et al. Aberrantly expressed recoverin is functionally associated with G-protein-coupled receptor kinases in cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:669–73.

Morán A, Ortega P, De Juan C, Fernandez-Marcelo T, Frías C, Sánchez Pernaute A, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010 March 15; 2(3): 151-158.

Morel PA, Ernst LK, Metes D. Functional CD32 molecules on human NK cells. *Leuk Lymphoma.* 1999 Sep;35(1-2):47-56.

Morris KT, Khan H, Ahmad A, Weston LL, Nofchissey RA, Pinchuk IV, et al. G-CSF and G-CSFR are highly expressed in human gastric and colon cancers and promote carcinoma cell proliferation and migration. *Br J Cancer*. 2014 Mar 4;110(5):1211-20.

Muhammad S, Jiang Z, Liu Z, Kaur K, Wang X. The role of EGFR monoclonal antibodies (MoABs) cetuximab/panitumab, and BRAF inhibitors in BRAF mutated colorectal cancer. *GastrointestOncol*. 2013; 4(1): 72–81.

Murray H, Latten M, Cartwright A, McAleer D, Fitzgerald S. Simultaneous Detection of Colorectal Cancer Mutations in Stool Samples with Biochip Arrays. *Journal of Medical Biochemistry*. 2009. 28(4), 285-292.

Näthke IS, Adams CL, Polakis P, Sellin JH, Nelson WJ. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol*. 1996 Jul;134(1):165-79.

Ng TL, Gown AM, Barry TS, Cheang MC, Chan AK, Turbin DA et al. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol*. 2005 Jan;18(1):68-74.

Noda I, Fujieda S, Ohtsubo T, Tsuzuki H, Tanaka N, Sunaga H, et al. Granulocyte-colony-stimulating factor enhances invasive potential of human head-and-neck-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 1999 Jan 5;80(1):78-84.

Noffsinger AE. Serrated Polyps and Colorectal Cancer: New Pathway to Malignancy. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2009; 4: 343-64.

Noffsinger AE, Hart J. Serrated Adenoma: A Distinct Form of Non-Polypoid Colorectal Neoplasia?. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 2010; 20: 543-563.

Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D et al. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia*. 2008 Jun;10(6):534-41.

O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J SurgPathol*. 2006; 30:1491-501.

Obermueller E, Vosseler S, Fusenig NE, Mueller MM. Cooperative autocrine and paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the progression of skin carcinoma cells. *Cancer Res*. 2004 Nov 1;64(21):7801-12.

Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009 Jan;58(1):90-6.

Oh K, Redston M, Odze RD. Support for hMLH1 and MGMT silencing as a mechanism of tumorigenesis in the hyperplastic– adenoma–carcinoma (serrated) carcinogenic pathway in the colon. *Hum. Pathol*. 2005; 36: 101–11.

- Oler G, Camacho CP, Hojaij FC, Michaluart P Jr, Riggins GJ, Cerutti JM. Gene expression profiling of papillary thyroid carcinoma identifies transcripts correlated with BRAF mutational status and lymph node metastasis. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 1;14(15):4735-42.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jan;2(1):a001008
- Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*. 1995 Sep 1;269(5228):1270-2.
- Ong BA, Vega KJ, Houchen CW. Intestinal stem cells and the colorectal cancer microenvironment. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(8):1898-1909.
- Ozawa S, Kato Y, Kubota E, Hata R. BRAK/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse. *Biomed Res*. 2009 Oct;30(5):315-8.
- Pandey JP, Kistner-Griffin E, Namboodiri AM, Black L, Jobim M. Suggestive evidence that Fc variants of IgG2 and FcγRIIa loci interact to contribute to the risk of prostate cancer. *Hum Immunol*. 2013 Dec;74(12):1656-8.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252-64.
- Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995 Dec 1;55(23):5548-50.
- Pattyn F, Robbrecht P, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. RTPPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database, major update 2006. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34, D684–D688.
- Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):199-206.
- Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2009 Jan;20(1):84-90.
- Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2059-72.
- Pokabla MJ, Dickerson IM, Papka RE. Calcitonin gene-related peptide-receptor component protein expression in the uterine cervix, lumbosacral spinal cord, and dorsal root ganglia. *Peptides*. 2002 Mar;23(3):507-14.

Posorski N, Kaemmerer D, Ernst G, Grabowski P, Hoersch D, Hommann M, et al. Localization of sporadic neuroendocrine tumors by gene expression analysis of their metastases. *Clin Exp Metastasis* 2011;28:637–47.

Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology*. 2010 Jan;56(2):167-79.

Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov;1(2):162-8.

Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*. 2011 Jan;60(1):116-29.

Qualtrough D, Singh K, Banu N, et al. The actin bundling protein fascin is over-expressed in colorectal adenomas and promotes motility in adenoma cells in vitro. *Br J Cancer* 2009;101:1124–9.

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002 Aug 29;418(6901):934.

Ramírez N, Bandrés E, Navarro A, Pons A, Jansa S, Moreno I et al. Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions. *Eur J Cancer*. 2008 Nov;44(17):2689-95

Rashid A, Houlihan PS, Booker S, Petersen GM, Giardiello FM, Hamilton SR. Phenotypic and molecular characteristics of hyperplastic polyposis. *Gastroenterology*. 2000 Aug;119(2):323-32.

Rathinam R, Berrier A, Alahari SK. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jun 1;16:2561-71.

Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res*. 2004 Dec 21;568(2):275-82.

Rex DK, Ulbright TM. Step section histology of proximal colon polyps that appear hyperplastic by endoscopy. *Am. J. Gastroenterol*. 2002; 97:1530-4.

Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*. 2006 Oct;16(10):522-9.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*. 2003;302:1704-9.

Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC Jr. ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery*. 2007 Jun;141(6):705-7.

Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, Denissenko MF. Carcinogenesis. Role of in invasion of human breast cells. 2005; 26: 943-950.

Rosty C, Bettington M. Serrated colorectal polyps and polyposis. *Diagnostic Histopathology*. 2013; 20: 30-37.

Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One*. 2013 Jun 13;8(6):e65479.

Rothlein, R. D. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *Journal of Immunology* 1986; 137: 1270–1274.

Rozek LS, Herron CM, Greenson JK, Moreno V, Capella G, Rennert G et al. Smoking, gender, and ethnicity predict somatic BRAF mutations in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Mar;19(3):838-43.

Rusan NM, Peifer M. Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. *J Cell Biol*. 2008 Jun 2;181(5):719-26.

Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Dec 6;98(23):1731-8.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):554.

Sanabria M, Umaña A, Serrano ML, Sánchez M, Mesa J, Hernández GA. Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas. *Ver ColombCancerol* 2012; 16 (3): 170-181.

Sawai H, Yasuda A, Ochi N, Ma J, Matsuo Y, Wakasugi T et al. Loss of PTEN expression is associated with colorectal cancer liver metastasis and poor patient survival. *BMC Gastroenterol*. 2008 Nov 26;8:56.

Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008;68:989–97.

Schweizerhof M, Stösser S, Kurejova M, Njoo C, Gangadharan V, Agarwal N et al. Hematopoietic colony-stimulating factors mediate tumor-nerve interactions and bone cancer pain. *Nat Med*. 2009 Jul;15(7):802-7.

Senda T, Iizuka-Kogo A, Onouchi T, Shimomura A. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol*. 2007 Jun;40(2):68-81.

Seshacharyulu P, Ponnusamy P, Haridas D, Jain M, Ganti A, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy.

Sharma SG, Gulley ML. BRAF mutation testing in colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Aug;134(8):1225-8.

Shepelev MV, Korobko IV. The RHOV gene is overexpressed in human non-small cell lung cancer. *Cancer Genet.* 2013; 206: 393-7.

Shepherd NA. Inverted hyperplastic polyposis of the colon. *J Clin Pathol.* 1993 Jan;46(1):56-60.

Simpson KJ, Dugan AS, Mercurio AM. Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcin. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8694-701.

Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9433-8.

Snover D, Ahnen D, Rea O. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis: WHO classification of tumors. In: *Pathology and genetics. Tumors of digestive system.* 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. 160-05.

Stefanius K, Ylitalo L, Tuomisto A, Kuivila R, Kantola T, Sirniö P, et al. Frequent mutations of KRAS in addition to BRAF in colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* 2011; 58: 679-692.

Suwa H, Ohshio G, Imamura T, Watanabe G, Arii S, Imamura M, et al. Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer.* 1998;77(1):147-52.

Suzuki K, Kobayashi Y, Morita T. Serum calcitonin gene-related peptide levels in untreated prostate cancer patients. *Int J Urol.* 2006 Jun;13(6):781-4.

Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, et al. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005 Aug;41(12):1802-10.

Teoh HH, Delahunt B, Isbister WH. Dysplastic and malignant areas in hyperplastic polyps of the large intestine. *Pathology.* 1989 Apr;21(2):138-42.

Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol* 2003;27:65-81.

Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999 Oct;9(5):349-57.

Uemura Y, Kobayashi M, Nakata H, Kubota T, Saito T, Bandobashi K, et al. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on lung cancer: roles of cyclooxygenase-2. *Oncol Rep.* 2007 Apr;17(4):955-61.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Feb 18;96(4):261-8.

Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115  
Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 23(10):1289-91.

Väyrynen JP, Tuomisto A, Klintrup K, Mäkelä J, Karttunen TJ, Mäkinen MJ. Detailed analysis of inflammatory cell infiltration in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013 Oct 1;109(7):1839-47.

Väyrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, Mäkelä J, Herzig KH, Karttunen TJ, et al. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer*. 2014 May 1;134(9):2126-35.

Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*. 2008 Jun 18;582(14):2093-101.

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8698–702.

Velho S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F, et al. BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: Primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis?. *BMC Cancer* 2008, 8:255.

Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell*. 2003 Jul;4(1):67-79.

Wang J, Yao L, Zhao S, Zhang X, Yin J, Zhang Y, et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells. *Cancer Biol Ther*. 2012 Apr;13(6):389-400.

Wang W, Huang P, Zhang L, Wei J, Xie Q, Sun Q, et al. Antitumor efficacy of C-X-C motif chemokine ligand 14 in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2013 Nov;104(11):1523-31.

Wang Z, Pedersen E, Basse A, Lefever T, Peyrollier K, Kapoor S et al. Rac1 is crucial for Ras-dependent skin tumor formation by controlling Pak1-Mek-Erk hyperactivation and hyperproliferation in vivo. *Oncogene*. 2010 Jun 10;29(23):3362-73.

Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001 Jun;48(6):821-9.

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-65.

Wente MN, Mayer C, Gaida MM, Michalski CW, Giese T, Bergmann F, et al. CXCL14 expression and potential function in pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2008 Feb 8;259(2):209-17. Epub 2007 Nov 28.

Wheeler J, Bodmer W, Mortensen N. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut* 2000; 47(1): 148–153.

Williams GT, Arthur JF, Bussey HJ, Morson BC. Metaplastic polyps and polyposis of the colorectum. *Histopathology*. 1980 Mar;4(2):155-70.

Winder SJ. The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 2001;26:118–124.

Wong HL, Peters U, Hayes RB, Huang WY, Schatzkin A, Bresalier RS et al. Polymorphisms in the adenomatous polyposis coli (APC) gene and advanced colorectal adenoma risk. *Eur J Cancer*. 2010 Sep;46(13):2457-66.

Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*. 2007 Jan;56(1):140-8.

Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol*. 2007 Jul 28;13(28):3784-91.

[www.cancer.org](http://www.cancer.org) acceso en Marzo/2014.

[www.intramed.net](http://www.intramed.net) acceso en Marzo/2014.

[www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3208](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3208) acceso Abril/2014.

[www.paintomics.org](http://www.paintomics.org).

Xiao D. and He J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J Thorac Dis*. Sep 2010; 2 (3): 154–159.

Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimaraes DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2634-2640.

Yang X, Liu F, Xu Z, Chen C, Wu X, Li G, et al. Expression of granulocyte colony stimulating factor receptor in human colorectal cancer. *Postgrad Med J*. 2005 May;81(955):333-7.

Yang XD, Huang P, Wang F, Xu ZK. Expression of granulocyte colony-stimulating factor receptor in rectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 28;20(4):1074-8.

Yao T, Nishiyama Ki, Oya M, Kouzuki T, Kajiwara M, Tsuneyoshi M. Multiple 'serrated adenocarcinomas' of the colon with a cell lineage common to metaplastic polyp and serrated adenoma. Case report of a new subtype of colonic adenocarcinoma with gastric differentiation. *J Pathol*. 2000 Mar;190(4):444-9.

Zeng J, Yang X, Cheng L, Liu R, Lei Y, Dong D, et al. Chemokine CXCL14 is associated with prognosis in patients with colorectal carcinoma after curative resection. *J Transl Med*. 2013 Jan 7;11:6.